



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BOUGADDIMA Yasmine et SEBAHA Zineb Mimouna

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie appliquée

THÈME

***Isolement et identification des bactéries
lactiques à statut probiotique à partir de
Sardina pilchardus.***

Soutenue publiquement le 03/07/2019

DEVANT LE JURY

Président	Mr B.BENBOUZIANE	Grade	MCB	U. Mostaganem
Encadreur	Melle I.YAHLA	Grade	MCB	U. Mostaganem
Examineurs	Mr A.CHAALEL	Grade	MCA	U. Mostaganem

*Thème réalisé au laboratoire pédagogique De microbiologie N°1 de
L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.*

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

PARTIE bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur les bactéries lactiques

I.1. Définition et caractéristiques 3

I.2. Habitat 4

I.3. Taxonomie et classification 4

I.4. Applications industrielles des bactéries lactiques 6

I.4.1. Domaine alimentaire 6

I.4.1.1. Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques 7

I.4.1.2. Rôle dans la conservation 7

I.4.2. Domaine de santé 7

I.4.3. En chimie 9

I.5. Biologie de la sardine (*Sardina pilchardus*) 9

I.5.1. Taxonomie 9

I.5.2. Morphologie et comportement 9

I.5.3. Répartition 10

I.5.4. Régime alimentaire 11

Chapitre II : Les probiotiques

II.1. Histoire des probiotiques 12

II.2. Rôle probiotique des bactéries lactiques 13

II.3. Mécanismes d'action des probiotiques 13

II.4. Les microorganismes probiotiques	14
II.4.1. Les bactéries lactiques	14
II.4.1.1. Les lactobacilles	15
II.4.1.2. Les coques :	16
II.4.1.3. Les bifidobactéries	17
II.5. Critères de sélection des souches probiotiques	18

Partie pratique

Chapitre III : Matériels ET Méthodes

III.1. Objectif et lieu du travail	22
III.2. Échantillonnage	22
III.3. La préparation des dilutions	23
III.4. Les milieux de cultures utilisés	23
III.5. Isolement des bactéries lactiques	25
III.6. Purification	25
III.7. Identification des souches	25
III.7.1. Pré-identification des isolats	25
III.7.1.1. Aspect macroscopique	25
III.7.1.2. Recherche de la catalase	25
III.7.1.3. Aspect microscopique	26
III.7.1.4. Coloration de gram	26
III.8. Conservation des souches	26
III.8.1. Conservation à courte durée	26
III.8.2. Conservation à longue durée	26
III.9. Identification des souches sélectionnées	27
III.9.1. Test physiologiques	27
Test de croissance à différentes températures (15°C et 37°C)	27
Test de croissance en présence de 2,5 ; 4 et 6,5 de Na Cl	27
Test de croissance à un milieu hyperalcalin	27
III.9.2. Tests biochimiques	27
Test de production de CO ₂ à partir du glucose	28
Test de production de CO ₂ à partir du citrate	28
III.9.3. Tests technologiques	28
Production d'Acétoïne	28

Hydrolyse de l'arginine (ADH).....	28
Production des exopolysaccharides	29
Test de la thermorésistance	29
Test de croissance en présence de bleu de méthylène	29
III.10. La Recherche d'une activité antimicrobienne.....	29
Chapitre IV : Résultats et discussions	
IV.1. Pré-Identification des isolats lactiques	32
IV.1.1.Critères morphologiques	32
Aspect macroscopique des souches :	32
Aspect microscopique des souches.....	32
IV.2. Identification des isolats	34
IV.2.1. Tests physiologiques.....	34
IV.2.1.1. Croissance dans les conditions hostiles.....	34
Test de croissance à différentes températures (15et 37°C).....	34
Test de croissance en présence de NaCl	35
Test de croissance à un milieu hyperalcalin	36
IV.2.2. Tests Biochimiques.....	37
Test de production de CO ₂ à partir du glucose	37
Test de production de CO ₂ à partir du citrate	37
IV.2.3. Test technologiques	38
Test de la mise en évidence d'arginine décarboxylase (ADH)	38
Production des Exopolysaccharides.....	38
Test de la production d'acétoïne.....	39
Test de la thermorésistance	40
Test de croissance en présence de bleu de méthylène	40
IV.3. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien	42
Conclusion	46

Références bibliographiques

Annexe

Remerciements

NOUS REMERCIONS TOUT D'ABORD ALLAH TOUT PUISSANT DE NOUS AVOIR DONNÉ
LA FORCE DE RÉALISER CE TRAVAIL.

NOUS TENONS À EXPRIMER NOTRE PROFONDE GRATITUDE ET NOS VIFS
REMERCIEMENTS À NOTRE PROMOTRICE MELLE YAHLA IMÈNE, D'AVOIR
ACCEPTÉ DE NOUS ENCADRER. NOUS LUI TÉMOIGNONS NOTRE GRATITUDE
ET NOTRE RECONNAISSANCE.

NOUS TENONS À REMERCIER MR BENBOUZIANE BOUASRIA MCB D'AVOIR ACCEPTÉ
DE PRÉSIDER NOTRE JURY

ET MR CHAALAL ABDELMALEK MCA D'AVOIR ACCEPTÉ D'EXAMINER NOTRE
TRAVAIL.

NOUS REMERCIONS L'ENSEMBLE DU PERSONNEL DU LABORATOIRE PÉDAGOGIQUE

DE MICROBIOLOGIE N°1 ITA POUR NOUS AVOIR PERMIS D'EFFECTUER

LES DIFFÉRENTS TESTS ET ANALYSES ET POUR AVOIR MIS

À NOTRE DISPOSITION LE MATÉRIEL ET LES MOYENS NÉCESSAIRES

À LA RÉALISATION DE NOTRE TRAVAIL.

NOUS TENONS À EXPRIMER NOS SENTIMENTS DE RECONNAISSANCE À TOUTES
LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ À CE TRAVAIL, QUI NOUS ONT APPRIS UNE
INFINITÉ DE CHOSES ET QUI NOUS ONT AIDÉ, CONSEILLÉ ET SOUTENU À TOUT
MOMENT AFIN DE RÉALISER CE TRAVAIL DANS LES MEILLEURES CONDITIONS.

YASSMINE & ZINEB MIMOUNA

Dédicaces

Je tiens vivement à dédier ce modeste travail :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour ;

A ceux qui m'ont aidé, encouragé et soutenu dans les moments

les plus difficiles et ceux à qui je dois tant

*A mes très chers parents zoubir et Fatiha pour leur amour,
tendresse et leur soutien continu ; qu'ils trouvent dans ce travail
la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond
amour.*

*A mes chers frères Mohamed lamine, Hassene et Sami Abdelhak
sans oublier mon futur mari Zohir qui m'ont soutenu avec leurs
encouragements et qui m'ont mené à Cet aboutissement, auxquels
je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

A tous mes amis, à mes copines SEBAHA Zineb et AZOUZI Narimene

A toute la promotion microbiologie appliqué 2018/2019.

YASSMINE

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur,

Mon plus chère papa «SEBAHA BOUCIF»

A celle qui m'a donné l'amour, la compréhension, la tendresse, la politesse

Ma très chère mère «BERRICHI FATIMA»

Que dieu les protèges et les garde pour moi

A ma source de joie, mes chères sœurs Zhor et Chahinez, ma nièce Zineb et mon neveu Mohamed

A mon trésor, ma fierté, mes frères Kacem et Abdelhalime

A la personne qui reste auprès de moi dans tous les moments, qui me donne la patience et l'espoir pour réaliser ce travail, à mon homme : khaled

A ma copine, ma sœur et à la fille avec qui je partage ce travail et aussi les moments agréables «Bougaddima Yassmine»

A tous les membres de ma famille

A ceux que j'aime beaucoup et qui étaient toujours à mes côtés mes très chères amies

A toute la promotion microbiologie appliqué 2018/2019.

ZINEB MIMOUNA

Résumé :

L'objectif de notre travail était l'isolement et l'identification des souches lactiques à partir du tractus gastro-intestinal de poisson marin : la sardine (*Sardina pilchardus*). Après leur isolement, les souches ont été caractérisées et identifiées par des méthodes physiologiques, biochimiques et technologiques.

Les six souches isolées ont été évaluées pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de cinq germes pathogènes. Les résultats de cette étude ont montré que les souches lactiques, isolées de *Sardina pilchardus*, possèdent un bon pouvoir inhibiteur. En effet, ces souches sont capables d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*. Mais, l'effet inhibiteur de ces souches était moins important contre *Staphylococcus aureus* et absent contre *Candida albicans*.

Mots clés : bactéries lactiques, *Sardina pilchardus*, germes pathogènes, tractus gastro-intestinal, pouvoir inhibiteur.

Abstract:

The objective of our work was the isolation and identification of lactic strains from the gastrointestinal tract of marine fish: sardine (*Sardina pilchardus*). After isolation, the strains were characterized and identified by physiological, biochemical and technological methods.

The six isolated strains were evaluated for their inhibitory properties against five pathogenic germs. The results of this study showed that lactic strains, isolated from *Sardina pilchardus*, have good inhibitory power. These strains are capable of inhibiting the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*. However, the inhibitory effect of these strains was less important against *Staphylococcus aureus* and absent against *Candida albicans*.

Keywords: lactic bacteria, *Sardina pilchardus*, pathogenic germs, gastrointestinal tract, inhibitory power.

المخلص :

كان الهدف من عملنا هو عزل وتحديد سلالات حمض اللبن من الجهاز الهضمي للأسماك البحرية: السردين (*sardina pilchardus*). بعد عزلها ، تميزت السلالات و حددت من خلال الأساليب الفزيولوجية والكيميائية الحيوية والتكنولوجية.

تم تقييم سلالات معزولة ستة لقوتها المثبطة ضد الجراثيم المسببة للأمراض الخمسة. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن السلالات اللبنية، المعزولة من *sardina pilchardus*، تمتلك قوة منع جيدة. في الواقع ، هذه السلالات قادرة على تثبيط نمو الإشريكية القولونية ، الزائفة الزنجارية ، العصوية العصوية. ولكن التأثير المثبط لهذه السلالات كان أقل أهمية ضد المكورات العنقودية الذهبية وغائبًا عن المبيضات.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللبن ، السردين *Pilchardus*، الجراثيم المسببة للأمراض ، الجهاز الهضمي المعوي، قوة المثبطة.

LISTE DES ABREVISATIONS

- **ACT** : Production d'actoine
- **ADH** : Arginine dihydrolase
- **ADN** : Acide DésoxyriboNucleique
- **ARN** : Acide RiboNucleique
- **BN** : Bouillon nutritif
- **CO₂** : Dioxyde de carbone
- **DXT** : Production dextrans
- **EPS** : Exopolysaccharides
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **G + C** : Guanine + Cytosine
- **GRAS** : Generally Regarded As Safe
- **LAB** : Bactéries de l'acide lactique
- **MH** : Muller et Hinton
- **MRS** : De Man Rogosa et Sharp
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **Ph** : Potentiel d'Hydrogène

Unités de mesures

- °C : Degré Celsius
- **H, min** : Heure, Minute
- **m, mm, µm** : Mètre, millimètre, micromètre
- **ml** : Millilitre
- **N** : Normalité
- **V/V** : Volume par Volume

Noms des genres bactériens

- ***B*** : *Bacillus*
- ***Bf*** : *Bifidobacterium*
- ***E*** : *Escherichia*
- ***En*** : *Enterococcus*

- *S* : *Staphylococcus*
- *St* : *Streptococcus*

LISTE DES TABLEAUX

Numéro du tableau	Titre	Page
Tableau 1	Principales caractéristiques physiologiques de bactéries lactiques	5
Tableau 2	Les principaux produits issus de la fermentation des bactéries	8
Tableau 3	Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'Homme	19
Tableau 4	Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques	21
Tableau 5	Liste des souches bactériennes et fongiques étudiées	30
Tableau 6	résumé de l'observation microscopique des souches isolées à partir de tractus digestif de <i>Sardina pilchardus</i> .	34
Tableau 7	résultats des tests de l'identification physiologique des souches lactiques isolées à partir de <i>Sardina pilchardus</i>	41
Tableau 8	activité inhibitrice de 06 isolats lactiques	44

LISTE DES FIGURES

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 1	Morphologie générale de la sardine, <i>Sardina pilchardus</i>	10
Figure 2	Répartition géographique de <i>Sardina pilchardus</i>	11
Figure 3	Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques	15
Figure 4	observation microscopique de <i>Lactobacillus casei</i>	16
Figure 5	observation microscopique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
Figure 6	observation microscopique de <i>Bifidobacterium longum</i>	18
Figure 7	Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire	20
Figure 8	la sardine commune : <i>Sardina pilchardus</i>	22
Figure 9	solution mère	23
Figure 10	tractus digestif dans la boîte pétri	23
Figure 11	Schéma présentant le protocole d'isolement des souches lactiques	24
Figure 12	les grandes étapes dans la recherche de l'activité antimicrobienne	31
Figure 13	aspect macroscopique sur milieu MRS solide des souches lactiques isolées à partir de <i>Sardina pilchardus</i> à 30°C	32
Figure 14	observation microscopique des souches lactiques après une coloration de Gram (Gx100)	33
Figure 15	catalase négative	34
Figure 16	résultat de croissance à 15C°	35
Figure 17	résultats de croissance à 37C°	35
Figure 18	test de croissance à 2.5% de NaCl	35
Figure 19	test de croissance à 4% de NaCl	35
Figure 20	test de croissance à 6.5% de NaCl	36
Figure 21	résultat de croissance en milieu hyperalcalin des isolats lactiques isolés à partir de <i>Sardina pilchardus</i>	36
Figure 22	la production du gaz par les isolats lactiques à partir du glucose	37
Figure 23	production de CO ₂ à partir de citrate par les isolats lactiques (Résultat négative).	37
Figure 24	mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase des isolats	38

	lactiques	
Figure 25	observation macroscopique des souches (S2 et S5) sur milieu hypersaccharosé isolées à partir de <i>Sardina pilchardus</i>	39
Figure 26	la production d'acétoïne par les isolats lactiques (résultats négatives).	39
Figure 27	résultat de la thermoresistance (résultats négatives) des isolats lactiques isolés à partir des <i>Sardina pilchardus</i> .	40
Figure 28	réduction du bleu de méthylène à concentration 0.1% par les isolats lactiques (S1, S2, S3 et S5)	40
Figure 29	réduction du bleu de méthylène à concentration 0.3% par l'isolat lactique (S3)	41
Figure 30	inhibition de la souche indicatrice <i>Bacillus cereus</i> par les souches lactiques	42
Figure 31	inhibition de la souche indicatrice <i>Pseudomonas aerogenosa</i> par les souches lactiques	43
Figure 32	inhibition de la souche indicatrice <i>E.coli</i> par les souches lactiques	43
Figure 33	inhibition de la souche indicatrice <i>S.aureus</i> par les souches lactiques	43

INTRODUCTION

Dans de nombreuses régions du monde, la sardine constitue une source essentielle de protéines animales, de vitamine, et joue un rôle important dans l'alimentation. Comme tous les poissons gras, elle présente une teneur élevée en acides gras insaturés oméga 3 qui lui confère des effets protecteurs sur la santé. Source de protéines de qualité, elle apporte d'importantes quantités de vitamine B12, vitamine D, mais aussi du calcium, du sélénium et du phosphore.

Au fil des dernières années beaucoup de chercheurs se sont intéressés à un nouvel angle d'étude concernant ce poisson. Leur curiosité s'est portée sur le tractus gastro intestinal et sa composition bactériologique.

En effet ce dernier est riche en espèces bactériennes de tous types, des aérobies, des anaérobies stricts, et des aérobies facultatifs. On compte parmi elles, les bactéries lactiques, elles ne sont pas considérées comme appartenant aux milieux aquatiques, mais certaines espèces (*Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*) ont été trouvées dans les poissons d'eau douce et leur environnement. , plusieurs études ont démontré que *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Carnobacterium* appartiennent au microbiote normal du tractus gastro-intestinal chez les poissons sains. **(Sahnouni et al, 2012)**

Les souches lactiques jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments. L'effet conservateur exercé par LAB est principalement dû à la production d'acides organiques (tels que l'acide lactique) qui entraîne une diminution des pH. Les LAB produisent également des composés antimicrobiens, notamment le peroxyde d'hydrogène, le CO₂, le diacétyle, l'acétaldéhyde, des acides aminés, et des bactériocines. **(Yang et al, 2012)** de ce fait elles exercent un effet protecteur contre toutes souches pathogènes pouvant provoquer des maladies. De nos jours les bactéries lactiques sont essentiellement utilisées pour leurs effets probiotiques.

Les probiotiques sont des micro-organismes utiles qui constituent la flore buccale et intestinale. Leur présence permet notamment de contrer la prolifération des micro-organismes nuisibles qui peuvent, par exemple, provoquer des diarrhées infectieuses. Les probiotiques contribuent également à la digestion des aliments. Plus particulièrement, il est établi que les produits laitiers fermentés, comme le yogourt, facilitent la digestion du lactose, notamment chez les personnes qui y sont intolérantes.

L'objectif de ce modeste travail consiste à isoler, caractériser et identifier des souches lactiques du tractus gastro-intestinal de *Sardina pilchardus* à évaluer leur activité antimicrobienne vis-à-vis de certains germes pathogènes.

Ce travail débute par une synthèse bibliographique qui résume dans un premier chapitre des généralités sur les bactéries lactiques, puis dans un deuxième chapitre, des généralités sur les probiotiques. Il se poursuit par la description des matériels et méthodes utilisés. Dans un troisième chapitre nous présentons nos résultats et leur discussion. Notre travail se termine par la conclusion.

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES BACTERIES

LACTIQUES

I.1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques appelées aussi bactéries de l'acide lactique (BAL) constituent un groupe très hétérogène de micro-organismes partageant divers aspects morphologiques, métaboliques et physiologiques, et dont la caractéristique fondamentale est la production de quantités appréciables de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme fermentaire. Les BAL sont des cellules procaryotes, hétérotrophes, et chimio-organotrophes.

Elles sont Gram positives, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aéro-tolérantes (micro-aérophiles). Elles sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme la catalase, la nitrate réductase et a cytochrome oxydase, aussi elles ne produisent pas d'indole ni acide sulfhydrique et certaines espèces hydrolysent la caséine. En raison de leur faible capacité biosynthétique, ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentes cibles (**Achemchem, 2014**).

Les bactéries lactiques sont parfois classifiées en fonction de leur température optimale de croissance : 20 à 30° C pour les mésophiles, 40 à 45° C pour les thermophiles. Ces deux grandes familles de bactéries n'ont pas également les mêmes métabolismes azotés : on considère que les mésophiles ne sont protéolytiques qu'après leur lyse, alors que les thermophiles sont protéolytiques durant leur phase de croissance. (**Joubert, 2016**)

Les bactéries lactiques sont généralement représentées par les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*. Cependant les critères de la taxonomie moderne ne considèrent les microorganismes appartenant aux genres *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Carnobacterium* comme appartenant aux bactéries lactiques. Toutefois le genre *Bifidobacterium* dans le phylum *Actinobacteria* appartient aussi aux bactéries lactiques (**Belkheir, 2017**).

I.2. Habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (**Bekhouche, 2006**). Il faut signaler, en outre, que les BAL font partie de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux homéothermes (**Achemchem, 2014**).

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus.

Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (**Makhloufi, 2011**).

Bien que non majoritaires, des bactéries lactiques ont souvent été isolées à partir du tractus gastro- intestinal des poissons. Des lactobacilles, notamment *Lactobacillus plantarum*, ont été retrouvés dans du saumon d'Atlantique (*Salmosalar*).

Les bactéries lactiques (BAL) ont joué un rôle important dans la technologie alimentaire. Les BAL comprennent une grande variété de types de cellules et de caractéristiques physiologiques et biochimiques. Elles sont souvent associées aux cavités buccales et aux intestins des animaux, par exemple. *Enterococcus faecalis* et feuilles de plante *Lactobacillus*, *Leuconostoc* (**Ekundayo, 2014**).

I.3. Taxonomie et classification

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla- Jensen**. Elle est basée sur des propriétés phénotypiques qui constituent la base de description, de différenciation et d'identification des bactéries lactiques.

Les méthodes phénotypiques incluent la croissance à différentes températures, la tolérance au NaCl, aux acides, à la bile ou à d'autres inhibiteurs, le type fermentaire (déterminé par la production de CO₂ en milieu glucosé), l'isomère optique de l'acide lactique produit par fermentation du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, de l'hippurate, de l'esculine, de l'amidon et de l'urée, le profil de fermentation des sucres et la production d'exopolysaccharides.

Le tableau 1 présente les principaux tests utilisés pour identifier les bactéries lactiques (Sahnouni, 2013)

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiologiques de bactéries lactiques (Sahnouni, 2013)

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Paralactobacillus</i>
Morphologie	Bacilles	Bacilles	Coques ovales	Coques/ bacilles	Coques	Coques	Coques	Coques	Bacilles
Gaz à partir de glucose	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-
Croissance à									
10°C	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	-
45°C	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	+	-
Isomère d'acide lactique	D, L, DL	L	D	DL, D	L	L	L, DL	L	DL
Hydrolyse d'arginine	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-
Mdap	+/-	+	-	-	-	-	-	-	ND
Croissance surgélose Rogosa SL	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-

À ce groupe de bactéries lactiques, appartiennent plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été

décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques.

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des différents sucres. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (Menad, 2017)

I.4. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation aux différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (streil et al, 2007).

I.4.1. Domaine alimentaire

I.4.1.1. Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières (Tableau 2), conduisant ainsi à de nombreux produits : saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale. Ils sont aussi utilisés en boulangerie traditionnelle. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (Daly et al, 1998 ; Hugenholtz et al, 2002 ; Axelsson, 2004 ; Streit et al, 2007).

Selon Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998), la fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de mille produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité.

En plus de l'industrie fromagère, les lactobacilles sont utilisés dans d'autres produits laitiers. Parmi ces produits, on trouve le Kuelenaoto et le Kwerioonik qui sont des produits ethniques du lait fermenté (Vizoso Pinto et al, 2006), le Laban zeer, le M'Bannick, le Koumiss et le Zincica (Codex alimentarius, 2003).

Pour les laits fermentés, l'acidification provoque la coagulation du lait (en facilitant l'action de la présure) et l'augmentation de la formation du caillé. Selon les produits, la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée; l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides et de mannitol (**Satura et Federighi, 1998**).

La production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que l'acétoïne, le diacétyl et l'acétaldéhyde ou l'éthanol sont responsables des saveurs caractéristiques (**Boudjemaa, 2008**).

Le lait ne pouvant pas être conservé longtemps, ses valeurs nutritionnelles sont gardées sous la forme d'un fromage. L'immense variété des fromages est en partie relative à une grande variété de souches employées dans leurs fabrications, modifiant ainsi le goût et la texture de ces produits. En effet, les bactéries lactiques sont responsables de l'apparition de qualités organoleptiques souhaitables de ce produit transformé, en plus de sa protection et sa conservation (**Van de Gudite et al, 2002**).

En fromagerie, les lactobacilles sont généralement utilisés pour la préparation de pâtes dures ou semi-dures typique des fromages suisses et italiens (**Alice et Sanchez-Rivas, 1997**).

Ces espèces participent dans l'affinage des fromages par leur activité protéolytique, et la formation d'arômes qui en résulte (**Lane et al, 1996 ; Lynch et al, 1996**).

La production du CO₂ par les bactéries lactiques provient de l'hétérofermentation du lactose et l'utilisation du citrate.

Dans la technologie des fromages à pâtes persillées, notamment le Roquefort, le CO₂ produit est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé, qui seront ensuite peuplées par *Penicillium roqueforti* (**Bourel et al, 2001**).

Le CO₂ produit donne aussi l'aspect légèrement effervescent et onctueux du beurre (**Kihal, 1996**).

I.4.1.2. Rôle dans la conservation

- **Production d'acide lactique** : Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

- **Production de bactériocines** : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, elles sont généralement thermorésistantes.

I.4.2. Domaine de santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XXème siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant sa flore. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques (Langella et al, 2001 ; Calvez et al, 2009). Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres

Tableau 2 : Les principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006)

Genre	Substrat	Exemple de produits
<i>Bifidobacterium</i>	lait	laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	viande	saucissons secs, jambons secs
	végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	céréales	pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	lait	fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	choucroute, olives, vin
	lait	fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	végétaux	choucroute
	viande	saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	végétaux	vin
<i>Streptococcus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, fromages

Restent encore controversés (Voir les bienfaits des probiotiques) (Langella et al, 2001 ; Calvez et al, 2009).

L'extraordinaire diversité de structures des exopolysaccharides (EPS) en fait une classe de molécules dont les applications directes ou indirectes dans le domaine médical sont en plein essor. Le dextrane et ses dérivés sont utilisés en laboratoire pour la purification de composés d'intérêt médical comme certaines enzymes, mais aussi comme outil thérapeutique en tant que

« plasma artificiel ». Ils peuvent servir pour l'encapsulation de médicaments dans le but d'un relargage contrôlé ou en exploitation des propriétés biologiques de ces polymères.

La préparation de vaccins à partir d'EPS évite l'utilisation d'extraits cellulaires et donc les effets secondaires provoqués par les métabolites tels que les lipopolysaccharides et les protéines (**Benasla, 2012**).

Il a été montré qu'un certain nombre d'exopolysaccharides possédaient des activités biologiques innovantes comparables à celles des héparinomimétiques, propriétés antitumorales ou antivirales par exemple.

L'extrême diversité des EPS a rendu possible l'identification d'homologies de structures avec des polysaccharides provenant de cellules eucaryotes. Ces analogues structuraux pourront être utilisés en substitut ou en complément des produits naturels (**Benasla, 2012**).

I.4.3. En chimie

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique (**Benasla, 2012**).

I.5. Biologie de la sardine (*Sardina pilchardus*)

I.5.1. Taxonomie

Les sardines appartiennent à un groupe taxonomique complexe qui regroupe les poissons pélagiques marins ou dulçaquicoles comme les aloses, les harengs. Dans le genre *Sardina*, il n'existe qu'une seule espèce, *Sardina pilchardus*, ou sardine européenne. Dans la suite de notre travail, pour des raisons de commodité, nous utiliserons le nom de sardine ou *Sardina pilchardus* (**Chlaida, 2009**).

La position systématique du poisson est la suivante (**Chlaida, 2009**):

- Embranchement : Vertébrés
- Classe : Ostéichtyens (poissons osseux)
- Sous-classe : Actinoptérygiens
- Ordre : Clupéiformes
- Famille : Clupeidae
- Genre : *Sardina*
- Espèce : *pilchardus*

I.5.2. Morphologie et comportement

La sardine possède un ventre argenté brillant et un dos bleuté (figure 1). Elle se caractérise par des écailles sessiles qui se détachent facilement du corps, un opercule strié, et les deux derniers rayons de la nageoire anale sont plus allongés que les précédents. Elle possède une série de taches sombres le long des flancs supérieurs (Benguendouz, 2017)



Figure 1 : Morphologie générale de la sardine, *Sardina pilchardus* (Benguendouz, 2017).

La sardine est une espèce pélagique grégaire dont la répartition est conditionnée surtout par la température et notamment par la richesse en plancton et l'hydrologie. Elle forme des bancs parfois très importants qui peuvent être composés d'individus d'âge et de sexe différents mais de taille similaire. Par contre si la sardine est moins importante, les bancs peuvent être composés de plusieurs espèces de petits pélagiques tels que les anchois.

Généralement la sardine est présente à des profondeurs de 30 à 55 m la journée et remonte à 15 à 35m de profondeur la nuit. Ces déplacements verticaux sont conditionnés par la luminosité et la quantité de nourriture suivant la migration nyctémérale du zooplancton. Elle effectue aussi des déplacements horizontaux de faible amplitude en fonction des saisons où elle migre du large vers les côtes durant le printemps et des côtes vers le large à la fin de l'automne. Elle réalise aussi des déplacements le long des côtes qui sont probablement conditionnés par l'âge des individus, la reproduction, la température et la disponibilité de la nourriture (Benguendouz, 2017).

I.5.3. Répartition

La sardine, *Sardina pilchardus*, est rencontrée en Atlantique Nord, en Méditerranée et en Mer Noire, sa répartition s'étend sur les côtes Atlantiques depuis le Dogger-bank en mer du Nord jusqu'à la côte saharienne en Mauritanie. Sa répartition et son abondance sont très influencées par les conditions hydroclimatiques, l'isotherme 13° C marque à peu près sa limite septentrionale et l'isotherme 25°C sa limite méridionale. Elle est présente depuis la Mer du

Nord jusqu'en Mauritanie avec des populations résiduelles aux Iles Madères, aux Açores et aux Iles Canaries.

L'aire de répartition de la sardine a vu, périodiquement, ses limites se décaler ou se rétracter selon les anomalies de température de l'eau. Au milieu des années 1960-1970, la limite sud de l'extinction de l'espèce s'est prolongée jusqu'au Sénégal, coïncidant avec une intensification de l'upwelling dans cette zone et s'est reculée dans le nord dans les années suivantes (figure 2) (Benguendouz, 2017).

I.5.4. Régime alimentaire

Les sardines se nourrissent de zooplancton, principalement de copépodes, cladocères, larves de crustacés, euphausiidae (krill) et de phytoplancton. Ce dernier, représenté entre autres par des Diatomées, est surtout abondant dans les contenus stomacaux des larves et des jeunes individus (Sahnouni, 2012).



Figure 2: Répartition géographique de *Sardina pilchardus* (Benguendouz, 2017).

CHAPITRE II

LES PROBIOTIQUES

CHAPITRE II : LES PROBIOTIQUES

II.1. Histoire des probiotiques

En fonction de la réflexion des chercheurs, des connaissances scientifiques et des avancées technologiques, le terme probiotique a bien évolué à travers le temps.

- Au début du **XX^{ème} siècle**, **Elie Metchnikoff**, savant ukrainien naturalisé français ayant travaillé à l'Institut Pasteur et prix Nobel en 1908 pour ses travaux sur la phagocytose, a été le premier à observer l'effet positif de certaines bactéries sur l'homme.
Metchnikoff supposa alors que « la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore de nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles ».
- A la même époque, en **1906**, le pédiatre français **Henry Tissier** a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhées contenaient un faible nombre de bifidobactéries par rapport aux selles d'enfants en bonne santé. Il suggéra alors d'administrer ces bactéries aux patients diarrhéiques pour les aider à restaurer un microbiote intestinal sain.
- Ce n'est qu'en **1917** que les probiotiques sont nés, le yaourt a été développé industriellement. Il était vendu exclusivement dans les pharmacies et sa consommation était alors recommandée pour traiter les troubles digestifs.
- Dès **1950**, de nombreux médicaments probiotiques ont été développés et commercialisés.
- En **1965**, **Lilly et Stillwell** parlaient des probiotiques comme des « facteurs capables de stimuler la croissance d'autres microorganismes ». Par la suite, en **1974**, **Parker** proposa d'élargir la définition à des « organismes ou substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore ».
- En **1989**, **Fuller** décida d'inclure à la définition des probiotiques les notions de viabilité et d'effets positifs exercés, et les désigna alors comme des « préparations microbiennes vivantes utilisées comme suppléments alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale»(**Piquepaille, 2013**)

Définition du terme probiotique par l'FAO et OMS en 2001

Les probiotiques sont donc définis comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

II.2. Rôle probiotique des bactéries lactiques

De nombreuses études rapportées, depuis une quinzaine d'années, montrant que les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées sous forme de probiotiques qui sont des préparations contenant des microorganismes et leurs métabolites, utilisés comme additifs alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'organisme de l'hôte.

Ces bactéries présentent des propriétés prophylactiques et thérapeutiques par exemple leur activité anticholestérolémiante, leur action anticarcinogène, leur potentiel vaccinal et l'effet protecteur des tractus digestif (**Chemlal, 2012**)

Plusieurs propriétés ont fait de certaines bactéries lactiques isolées des produits marins de bons candidats comme probiotiques chez certaines espèces animales aquatiques.

Pour être considéré comme probiotique, un micro-organisme ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie. Les probiotiques doivent être capables de moduler la réponse immunitaire et/ ou produire des substances antimicrobiennes. Ils doivent être aussi capables de survivre et de proliférer dans les milieux naturels occupés par des bactéries pathogènes (**Sahnouni, 2012**).

II.3. Mécanismes d'action des probiotiques

Les probiotiques, une fois arrivés sur leur site d'action, exercent des effets directs sur le microbiote et les cellules immunitaires. Les mécanismes d'action sont souvent complexes, multiples, et varient d'un probiotique à un autre.

On observe une augmentation transitoire du nombre de bactéries au sein de la flore endogène. Voici ci-dessous la liste non exhaustive des fonctions envisagées des probiotiques dans l'organisme.

- ✓ **Immunomodulation**(stimulation et inhibition) En effet, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires peut être dépendante de la viabilité des souches probiotiques et l'intensité de la réponse cytokinique peut être dépendante de la souche et de la dose. En premier lieu, des probiotiques peuvent transloquer au niveau des plaques de Peyer pour migrer vers les ganglions mésentériques et permettre l'activation d'une immunité plus forte vis-à-vis d'agents pathogènes. Les probiotiques vont pouvoir orienter la réponse immune via l'intermédiaire des cellules dendritiques.
- ✓ Diminution de l'inflammation par des cytokines anti-inflammatoires notamment dans les maladies inflammatoires chroniques
- ✓ Activation des macrophages locaux pour augmenter la présentation des antigènes aux lymphocytes B.

- ✓ Renforcement de la barrière épithéliale : augmentation de l'expression des gènes de mucines et donc par conséquence une inhibition de l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales
- ✓ Production de bactériocines pour inhiber les bactéries pathogènes - Diminution de la perméabilité intestinale grâce à un maintien du cytosquelette des cellules épithéliales
- ✓ Augmentation de la sécrétion d'Ig A sécrétoires protectrices notamment les IgA anti-rotavirus
- ✓ Inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales et stimulation de leur croissance, qui va renforcer l'effet barrière
- ✓ Réduction du pH pour créer un environnement défavorable inhibant le développement d'E. coli et des salmonelles
- ✓ Compétition des sites d'attachement : en effet si les bactéries probiotiques occupent les sites de la barrière épithéliale, les bactéries pathogènes ne pourront pas s'implanter
- ✓ Inhibition de la production de toxines des bactéries pathogènes
- ✓ Inhibition de l'adhésion de bactéries pathogènes par glycosylation apicale des cellules épithéliales
- ✓ Diminution de la translocation bactérienne Augmentation de la phagocytose par une augmentation des récepteurs de la phagocytose
- ✓ Rééquilibrage de la flore intestinale et uro-génitale
- ✓ Utilisation comme adjuvant dans la vaccination ou comme véhicule d'antigènes vaccinaux
- ✓ Production et stimulation d'enzymes pour une meilleure digestibilité alimentaire, augmentation de l'absorption des vitamines et minéraux
- ✓ Amélioration des activités enzymatiques telles que la lactase, la glycosidase et les activités de la phosphatase alcaline car les probiotiques possèdent eux même ces enzymes(**Bultel, 2017**).

II.4. Les microorganismes probiotiques

Les probiotiques sont des bactéries ou des levures ingérées vivantes, présentes ou non dans le microbiote intestinal résident. Ils se répartissent en trois principaux groupes (Tableau 3). Les souches les plus utilisées sont des bactéries lactiques qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*(**Piquebaille, 2013**).

II.4.1. Les bactéries lactiques

On parle de bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires. Elles incluent les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostocet* *Pediococcus*.

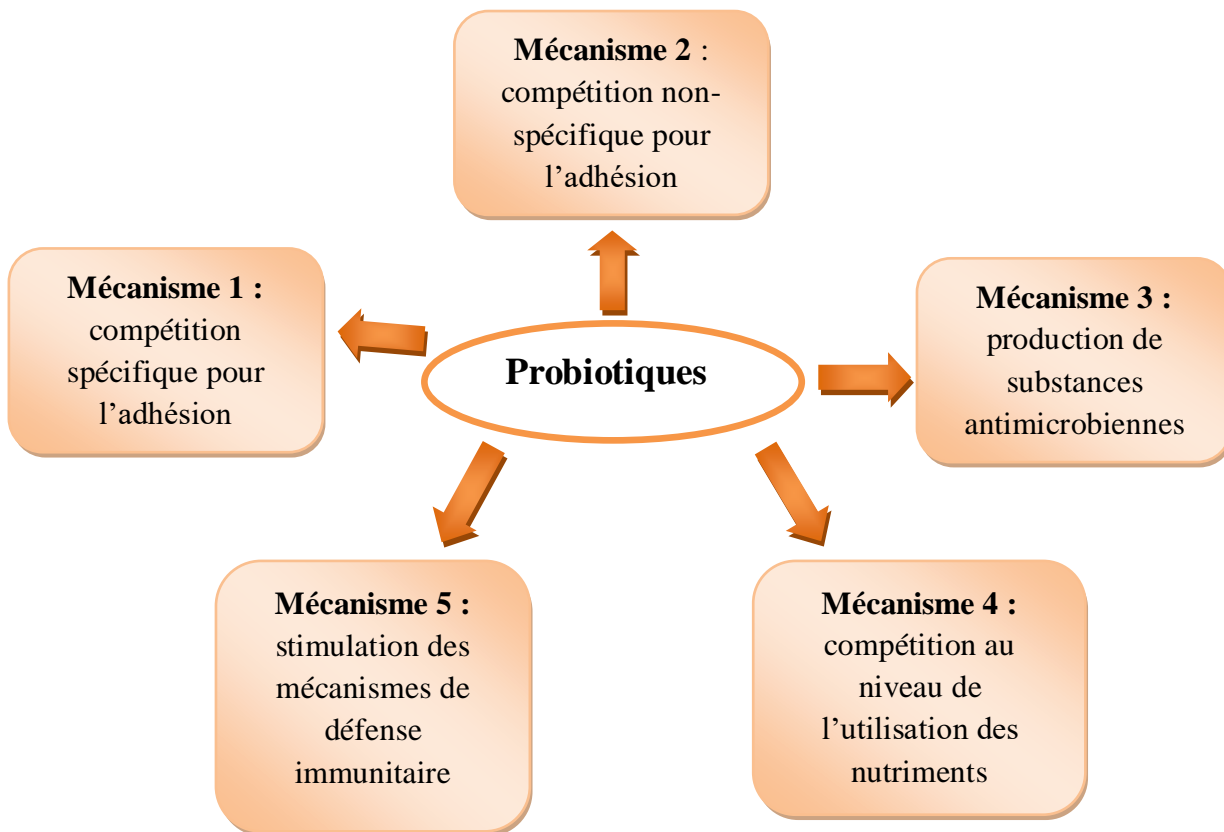


Figure 3: Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (Chemlal, 2012)

Ce sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies ou microaérophiles, uniquement capables de fermentation en aérobiose ou en anaérobiose. Le pourcentage en bases guanine et cytosine (% GC) de leur ADN montre une hétérogénéité des espèces constituant ces genres. Selon leur morphologie, les bactéries lactiques peuvent être divisées en trois catégories : les lactobacilles, les coques et les bifidobactéries (Piquebaille, 2013).

II.4.1.1. Les lactobacilles

Les lactobacilles font partie du :

- Phylum : des *Firmicutes*,
- classe : des *Bacilli*,
- ordre : des *Lactobacillales*
- famille : *Lactobacillaceae*.

Ces bactéries ont une forme de bâtonnets qui sont souvent groupés en chaînettes (Piquebaille, 2013).

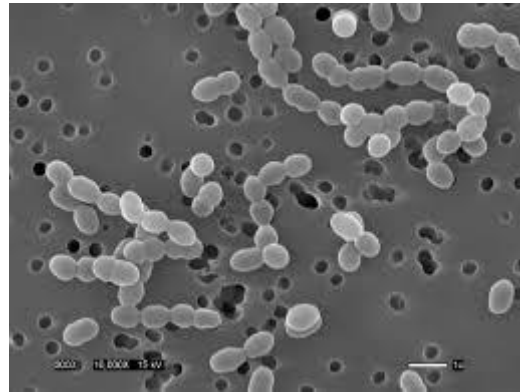


Figure 4 : Observation microscopique de *Lactobacillus casei* (Piquebaille, 2013).

Le genre *Lactobacillus* regroupe à ce jour plus de cent espèces, largement répandues dans les règnes humain, animal et végétal. Elles sont présentées dans des milieux très différents (lait fermentés comme le kéfir, végétaux fermentés comme la choucroute, le tube digestif de l'homme et des animaux...). Les lactobacilles sont les bactéries majoritairement utilisées comme probiotiques, en particulier *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* et *L. rhamnosus*, car ces trois espèces offrent une bonne résistance à l'acidité gastrique et présentent une forte capacité d'adhérence aux cellules intestinales (Piquebaille, 2013).

II.4.1.2. Les coques :

Les bactéries lactiques des genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont des coques sphériques ou ovoïdes, généralement groupés en paires, en chaînettes ou en tétrades (Piquebaille, 2013).



Figure 5 : Observation microscopique de *Streptococcus thermophilus* (Piquebaille, 2013).

Seuls les *Streptococcus*, les *Enterococcus* et éventuellement les *Lactococcus* sont utilisés comme probiotiques. Ces trois genres appartiennent au :

- phylum : des *Firmicutes*,
- classe : des *Bacilli*,
- l'ordre : des *Lactobacillales*
- famille : des *Streptococcaceae*.

Les Streptocoques appartiennent en majorité au genre *Streptococcus*, qui comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale. Certaines sont pathogènes et ne sont donc pas utilisées comme probiotiques, mais d'autres sont saprophytes de la cavité orale ou de l'intestin de l'homme. L'espèce *Streptococcus thermophilus*, largement présente dans le lait et les produits laitiers comme agent d'acidification, possède le statut GRAS et est utilisée dans certains produits probiotiques.

Les espèces du genre *Enterococcus* se caractérisent par leur grande résistance aux facteurs environnementaux. Elles sont présentes notamment dans l'intestin de l'homme et des animaux, les produits végétaux, le sol et les produits laitiers. Les espèces *Enterococcus faecalis* et *E. faecium*, anciennement désignées « streptocoques fécaux », sont toutes les deux utilisées comme probiotiques.

Les espèces du genre *Lactococcus* ne possèdent aucun caractère pathogène. Elles sont largement présentes dans le lait et les produits laitiers, mais les produits végétaux constituent leur réservoir principal. Seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée pour ses effets probiotiques (**Piquebaille, 2013**).

II.4.1.3. Les bifidobactéries

Les bifidobactéries ont été observées pour la première fois en 1900 par Tissier dans des selles d'enfants. Anciennement classé dans les lactobacilles sous le nom de *Lactobacillus bifidus*, le genre *Bifidobacterium* se différencie des autres bactéries lactiques par leur % GC élevé (de 55 à 67 %) et par la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate, qui leur permet de fermenter les glucides en produisant plus d'acide acétique que d'acide lactique et de faibles quantités d'acides organiques et d'éthanol. Les bifidobactéries appartiennent :

- phylum et à la classe : des *Actinobacteria*,
- sous-classe : des *Actinobacteridae*,
- l'ordre : des *Bifidobacteriales*
- la famille : des *Bifidobacteriaceae* (**PIQUEBAILLE, 2013**).

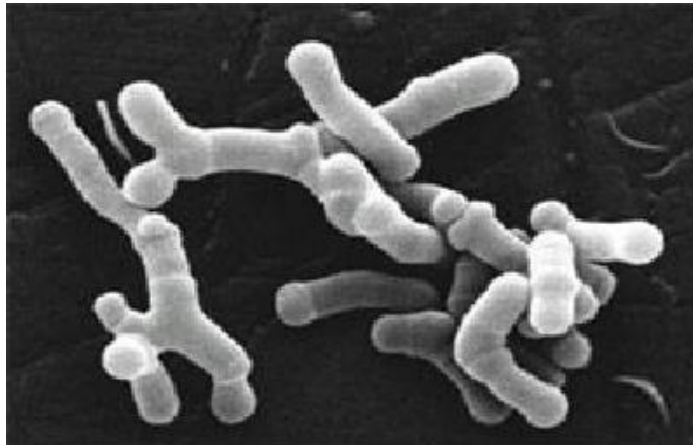


Figure 6 : Observation microscopique de *Bifidobacterium longum* (Piquebaille, 2013).

Les *Bifidobacterium* sont d'origine humaine ou animale. On les trouve également en grandes quantités dans les eaux résiduaires. Chez l'homme, ce sont des commensaux de la bouche, des bronches, du vagin et surtout de l'intestin. Ils colonisent par voie orale, à partir de la flore vaginale ou fécale maternelle, le tube digestif des nourrissons entre le deuxième et le cinquième jour après la naissance et deviennent dominants. Leur implantation est favorisée par l'allaitement maternel. La population de *Bifidobacterium* diminue ensuite avec l'âge chez les adultes, mais constitue le microbiote dominant tout au long de la vie. Les espèces de *Bifidobacterium* varient également selon l'âge : le côlon des enfants présente essentiellement les espèces *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* et *B. longum*; alors que les espèces qui dominent chez les adultes sont *B. longum* et *B. adolescenti*. De par leurs caractéristiques chimiques et leurs propriétés, de nombreuses espèces de *Bifidobacterium* sont employées comme probiotiques (Piquebaille, 2013).

II.5. Critères de sélection des souches probiotiques

Il est nécessaire d'établir des critères rationnels pour le criblage et la sélection des microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées sur l'homme avec des essais cliniques contrôlés. C'est un comité mixte d'expert FAO/OMS qui a établi les critères et une méthodologie à utiliser pour l'évaluation des probiotiques et défini des données nécessaires à la justification des allégations santé. La figure 7 résume les lignes directrices exposées dans le rapport rendu par ce comité. Il est ainsi recommandé de suivre celles-ci préalablement à toute allégation concernant un produit probiotique (Piquebaille, 2013).

Tableau 3 : Principales souches probiotiques (Piquebaille, 2013).

Bactéries lactiques			Non lactiques
Espèces de lactobacillus	Espèces de bifidobactérium	Autres	
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. brevis</i>			<i>B. subtilis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. crispatus</i>		<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. lactis</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. salivarius</i>			

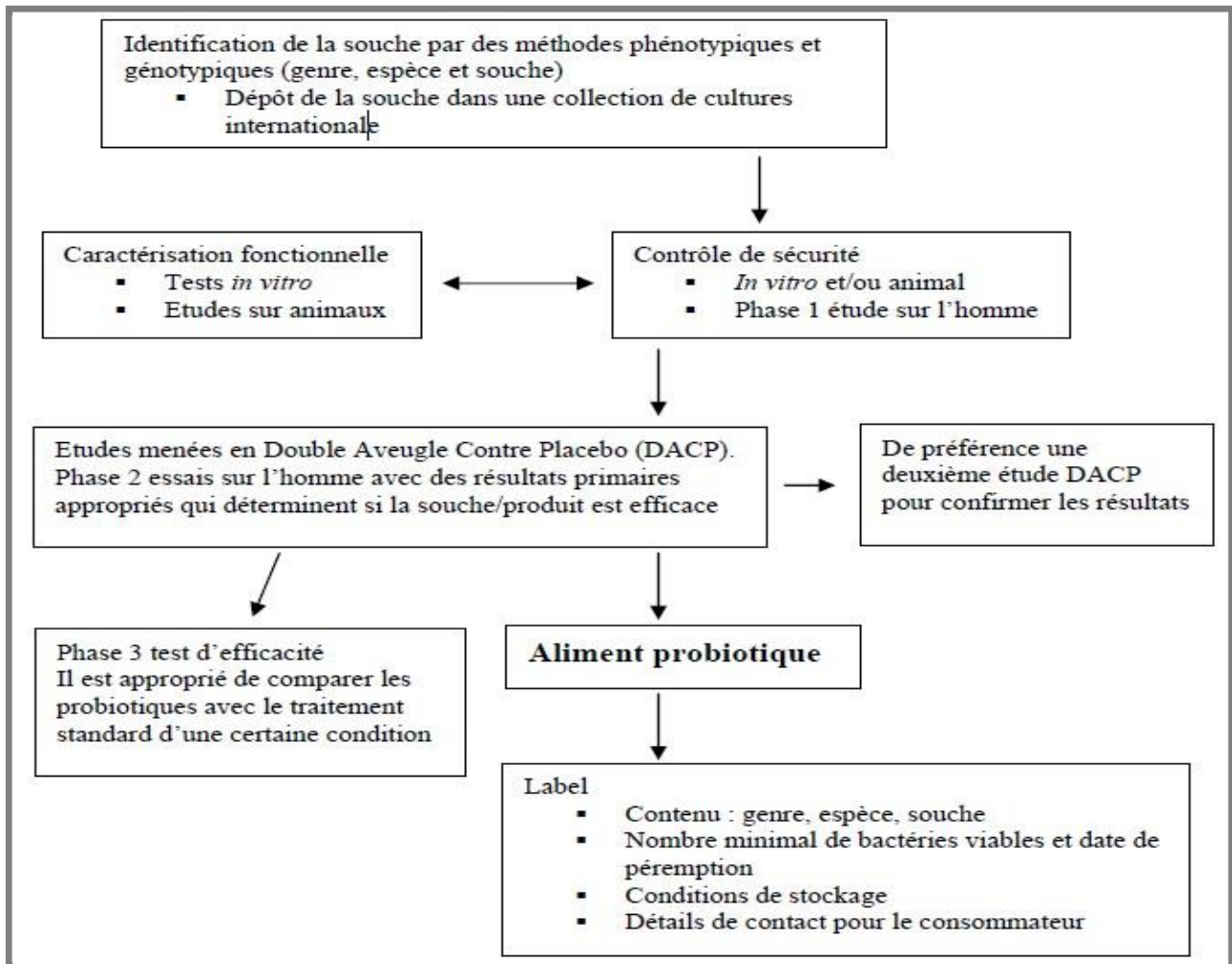


Figure 7: Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire (Izquierdo Alegre, 2009).

En plus d'assurer l'absence totale de toxicité ou de pathogénicité de la souche, et afin de satisfaire la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte. Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères qui sont décrits dans le (Tableau 4). Ces critères de sélection, ainsi que le test *in vitro* utilisés se réfèrent souvent à des propriétés bactériennes, telles que l'adhésion aux cellules épithéliales, la résistance aux conditions gastriques et la production de bactériocines, et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits. Ces derniers sont en effet plus difficiles à mesurer et il n'existe pas de tests *in vitro* établis capables de les déterminer de manière fiable (Piquebaille, 2013).

Tableau 4: Critères sélection des souches probiotiques (Izquierdo Alegre, 2009).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • Historique de non pathogénicité (GRAS) • Souche d'origine humaine ou alimentaire • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques • Souche déposée dans une collection de cultures internationale • Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques • Pas de déconjugaison excessive des sels biliaires
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité gastrique • Tolérance à la bile • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines) • Adhésion à divers lignées de cellules intestinales et au mucus • Stimulation du système immunitaire.
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours de procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production

CHAPITRE III

Matériels ET Méthodes

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1. Objectif et lieu du travail

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique microbiologie N=1 de l'université durant la période entre les mois de février et avril. On a procédé à l'étude et l'évaluation de la survie de souches de bactéries lactiques (S1, S2, S3, S4, S5, S6) isolées à partir de l'intestin de sardine « *Sardina pilchardus* » fraîchement pêchée obtenue du port de la wilaya de Mostaganem (Salamandre).

III.2. Échantillonnage

Sur un nombre de *Sardina pilchardus*, lavées et essuyées au préalable et dans des conditions d'asepsies, on a prélevé 1g d'intestin. Ensuite ils ont été broyés dans un flacon stérile contenant 9 ml d'eau péptonée et homogénéisés par le vortex. Une fois le mélange obtenu celui-ci est laissé à une température ambiante pendant 24h (**Najjari et al ; 2007**) .



Figure 8 : la sardine commune : *Sardina pilchardus*.



Figure 9 : solution mère



Figure 10 : tractus digestif dans la boîte pétri

III.3. La préparation des dilutions

1 ml de la solution mère a été pris et dissout dans 9 ml d'eau péptonée. Ensuite une série de dilution est préparée à partir de l'homogénat (10^{-1}) jusqu' à une dilution (10^{-7}).

III.4. Les milieux de cultures utilisés

Dans notre travail, on a utilisé deux milieux pour l'isolement et l'identification des souches, milieux solides et milieux liquides :

- **Gélose MRS:** est utilisée pour la culture et dénombrement des quelques bactéries lactiques dans les différents tests.
- **Bouillon MRS:** utilisé pour la réactivation des bactéries lactiques.
- **Bouillon nutritif :** utilisé pour la réactivation des souches pathogènes.
- **Eau péptonée :** utilisé pour l'enrichissement des souches.

La composition et le mode de préparation de ces milieux sont indiqués dans l'Annexe.

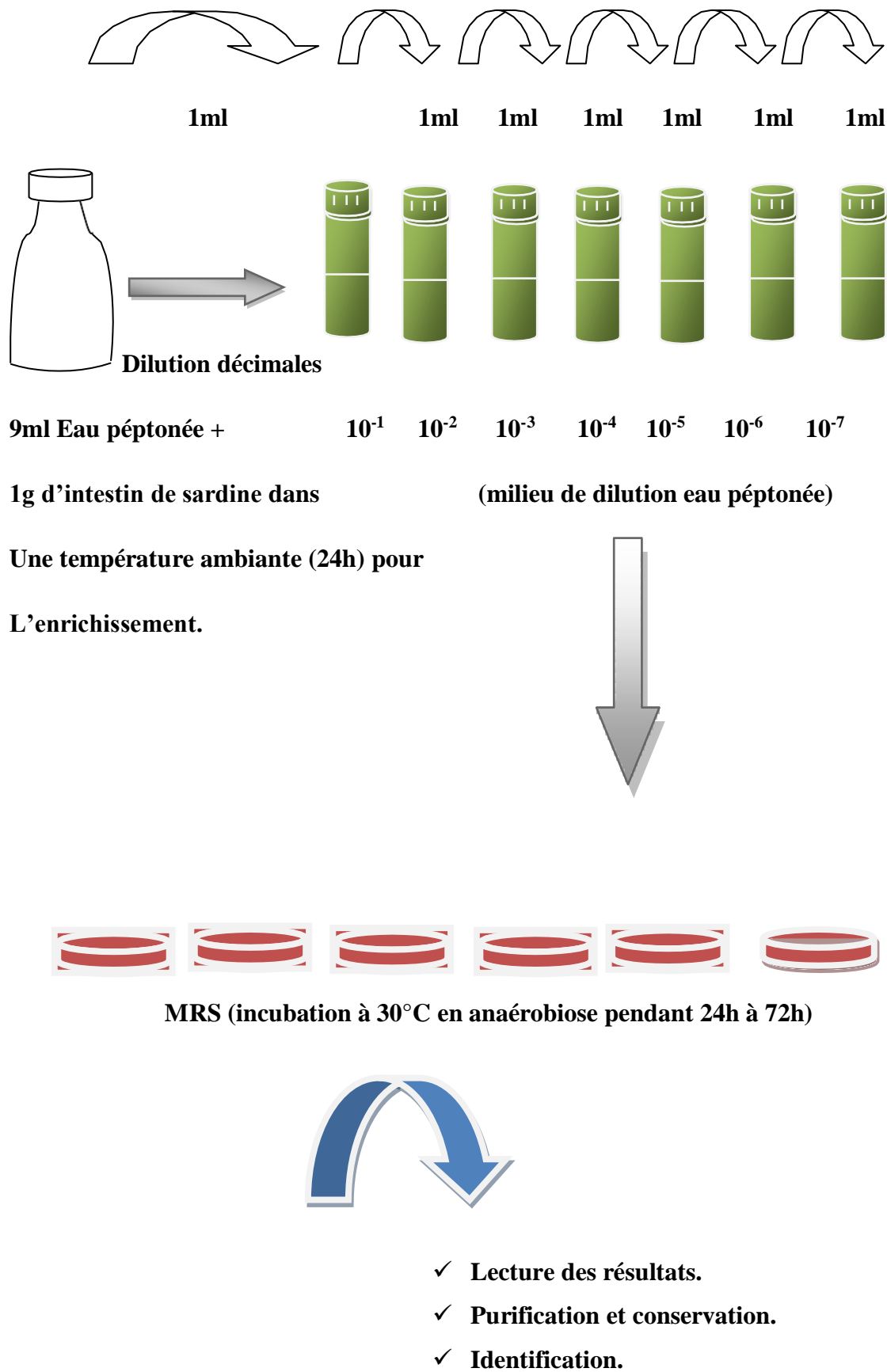


Figure 11 : Schéma présentant le protocole d'isolement des souches lactiques (Najjari et al ; 2007).

II.5. Isolement des bactéries lactiques

Une fois la dilution est faite, il faut prendre Cent microlitres (0,1ml) des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) puis les étalées sur la surface de la boîte pétri qui contient le milieu MRS gélosé à PH 6.2.

L'incubation se fait dans une jarre d'anaérobiose à 30 °C pendant 24h à 72h.

II.6. Purification

Après avoir effectué deux tests (coloration de Gram et test de catalase) sur les bactéries obtenues. Seules celles à Gram positif et à catalase négative ont été gardées. Une colonie est prélevée de chaque boîte puis ensemencée dans le même milieu (MRS gélosé) par la méthode des stries. L'incubation se fait en anaérobiose à 30°C pendant 24h à 48h.

La pureté des souches se confirme par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur.

III.7. Identification des souches

III.7.1. Pré-identification des isolats

III.7.1.1. Aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation de la culture des isolats sur gélose MRS pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies (**Badis et al, 2005**)

III.7.1.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existant chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence d'oxygène. En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les bactéries aérobies une chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène en aboutissant à de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) connu pour sa haute toxicité pour les bactéries. La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



La recherche de cette enzyme est effectuée simplement par la mise en contact d'une colonie avec une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10V. Un dégagement gazeux abondant traduit la présence d'une catalase. Les bactéries lactiques sont catalase négative (**Hassaine, 2012**).

III.7.1.3. Aspect microscopique

L'observation microscopique au grossissement ($G \times 100$) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Mami, 2012**).

III.7.1.4. Coloration de gram

Ce type de coloration permet de séparer les bactéries en deux grandes catégories: les bactéries Gram (+) et les bactéries Gram (-), celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage sont dites Gram (+) et celles qui sont décolorées et prennent ensuite la coloration d'un second colorant, sont dites Gram (-). Cette méthode est basée sur la différence de la paroi chez les deux grands groupes des bactéries, forte proportion de lipides chez les Gram (-) et faible proportion chez les Gram (+) (**Moumene, 2015**)

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon puis laissée refroidir à l'air libre. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée au lugol. Recouverte avec du lugol pendant 1 min, la préparation a ensuite été rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s. La lame ainsi rincée, a été soumise à une décoloration à l'éthanol pendant environ 15 s jusqu'à ce que l'étalement ait pris une couleur gris-bleu puis rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s avant d'être colorée à la safranine pendant 1 min, rincée à nouveau à l'eau distillée puis séchée. Les lames sont examinées au microscope optique (objectif 100/ grossissement $\times 100$) pour différencier leur morphologie, leur disposition et leur type de Gram (**Makhloufi, 2011**).

III.8. Conservation des souches

Deux types de conservation ont été appliqués. Une à courte et l'autre à longue durée.

III.8.1. Conservation à courte durée

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Badis et al, 2005**).

III.8.2. Conservation à longue durée

Pour une conservation à long terme, à partir des cultures de 18h (milieu liquide), le milieu de conservation contient 70% d'une solution de suspension bactérien et de glycérol à 30%. Les cultures sont conservées en tube Eppendorfs à -20°C. Avant toutes utilisations des souches,

une culture congelée était réactivée et repiquée sur son milieu pendant deux nuits successives (**Boldus et al, 2006**).

III.9. Identification des souches sélectionnées

➤ Tests physiologiques, biochimiques et technologiques.

III.9.1. Test physiologiques

▪ Test de croissance à différentes températures (15°C et 37°C)

Ce test est réalisé pour les cocci et les bacilles, il permet de différencier les souches thermophiles des mésophiles, ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 72 heures (jusqu'à une semaine) à 15 et 37 °C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

▪ Test de croissance en présence de 2,5 ; 4 et 6,5 de Na Cl

Ce test permet de savoir si les bactéries ont la capacité de croître dans un milieu hypersalé, ce qui permet classiquement de distinguer les entérocoques et les cocci. La méthode consiste à ensemencer ces bactéries dans des tubes de milieu MRS à 2,5 ; 4 et 6,5% de NaCl et les incuber à 30°C pendant 24 à 72 heures. Après incubation, la croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

▪ Test de croissance à un milieu hyperalcalin

Ce test est réalisé uniquement pour les cocci en milieux MRS dont le pH est ajusté à 9,6. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 72 heures en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

III.9.2. Tests biochimiques

▪ Test de production de CO₂ à partir du glucose

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires (**Guiraud, 2003**).

Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO₂). De jeunes souches préalablement préparées sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Hariri et al, 2009**).

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ a proportions égales (Carr et al, 2002)

- **Test de production de CO₂ à partir du citrate**

Une série de tubes de lait écrémé stérile (10%) est préparée. on ajoute 0,5ml d'une solution de citrate de sodium (10%) dans chaque tube. Après agitation, on laisse reposer 30minutes. Chaque tube est inoculé par 0.1 ml d'une culture jeune et additionné de 4ml d'une gélose blanche fondue et refroidie. Après mélange et solidification, on incube à 37°C pendant aux moins 3 jours. La production de gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube (Sahnouni, 2013).

III.9.3. Tests technologiques

- **Production d'Acétoïne**

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) après une culture de 24h à 37°C sur milieu Clark et Lubs (**annexe**).

Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 95°). Agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min.

La présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu(**Belarbi, 2011**).

- **Hydrolyse de l'arginine (ADH)**

Elle est mise en évidence sur un milieu de Moëller, pour chaque souche isolée ensemencé ; un tube de bouillon Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine (V/V) stérilisé. Après 2 à 6 jours d'incubation à 37°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet (**Belarbi, 2011**).

▪ Production des exopolysaccharides

La production de dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu hypersacharosé gélosé. Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'indentification permettant aussi de différencier entre les *Leuconostocs* productrices et non productrices de dextrane (Mami, 2012).

▪ Test de la thermorésistance

Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (Mahi, 2010).

▪ Test de croissance en présence de bleu de méthylène

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a étéensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Les lactocoques réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant (Menad, 2017).

III.10. La Recherche d'une activité antimicrobienne

a) Méthode direct

Cette méthode permet de tester l'effet inhibiteur de la culture lactique par contact direct vis-à-vis des souches pathogènes. Les cultures inhibitrices sont cultivées en milieu MRS liquide, tandis que la souche indicatrice est cultivée dans le bouillon nutritif, puis incubées pendant 18h à 37°C. 21 ml du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boites de pétri stériles. Après solidification du milieu, les boites sontensemencées par la culture indicatrice (pathogène). Ensuite, les disques de papiers Wattman stériles de 06 mm de diamètre sont imprégnés dans le bouillon MRS de la souche inhibitrices et déposés sur la gélose.

Les cultures sont portées à incubation à 37 C° pendant 24h, un résultat positif se traduit par la présence de zones d'inhibition formées autour des puits (Zergoug, 2017).

b) Méthode indirect**Préparation du surnageant actif**

Après la préparation de la pré-culture lactique, cette dernière est centrifugé à 5000 tours /10 min afin d'obtenir le surnageant qui est par la suite filtré à l'aide de filtre millipore d'un diamètre de 0.45 µm.

On a divisé le surnageant obtenu en deux volumes, le premier a été neutralisé par NaOH 1N de façon à obtenir un pH de 6.50 et le deuxième on l'a laissé à pH initial.

Les boîtes sont recouvertes par la souche pathogène initialement préparée (DO=0.08 à 625nm), Des disques de papiers Wattman stériles de 06 mm de diamètre sont imprégnés dans le surnageant filtré et déposés sur la gélose qui a été préalablementensemencée avec la souche pathogène. (Surnageant filtré, surnageant filtré et neutralisé). Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

➤ **Souches pathogènes utilisées pour l'activité anti microbienne**

L'activité anti bactérienne des bactéries lactiques isolées a été testée contre cinq souches pathogènes représentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des souches bactériennes et fongiques étudiées.

Souches	Code	Famille
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	<i>Bacillaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	<i>Saccharomycetaceae</i>

ATCC: American Type Culture Collection.

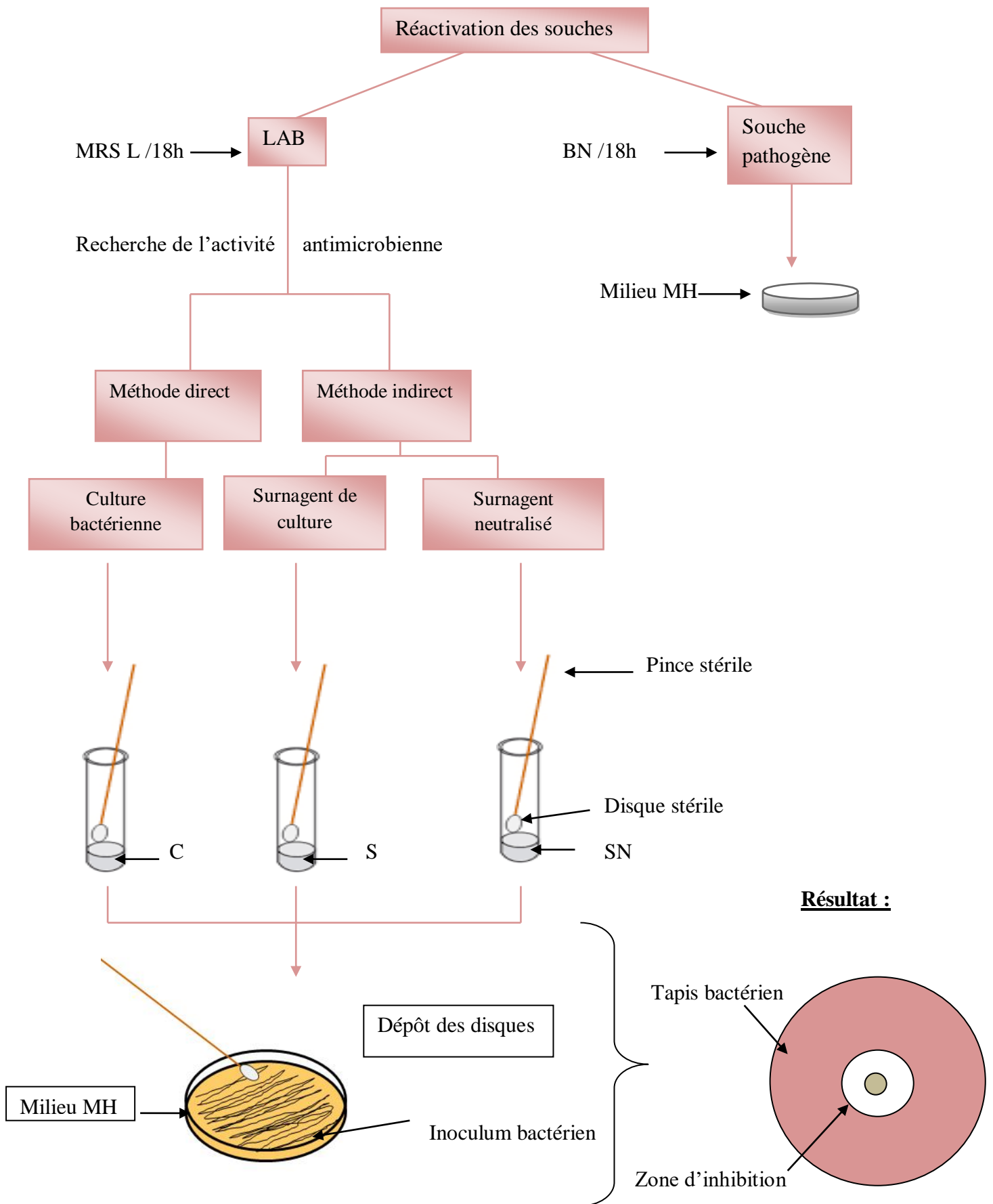


Figure 12 : les grandes étapes dans la recherche de l'activité antimicrobienne (Menad, 2017).

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Pré-Identification des isolats lactiques

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir de *Sardina pilchardus* par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les isolats ayant le Gram positif et la catalases négative sont étudiés.

IV.1.1. Critères morphologiques

✓ Aspect macroscopique des souches :

L'examen macroscopique sur milieu solide MRS montre des colonies circulaires, bombées et de couleur blanche, leur taille est d'environ 1 mm à 2 mm de diamètre, une deuxième forme de colonie irrégulière, érodée, de couleur crème et de 1 à 3 mm de diamètre (figure 13).

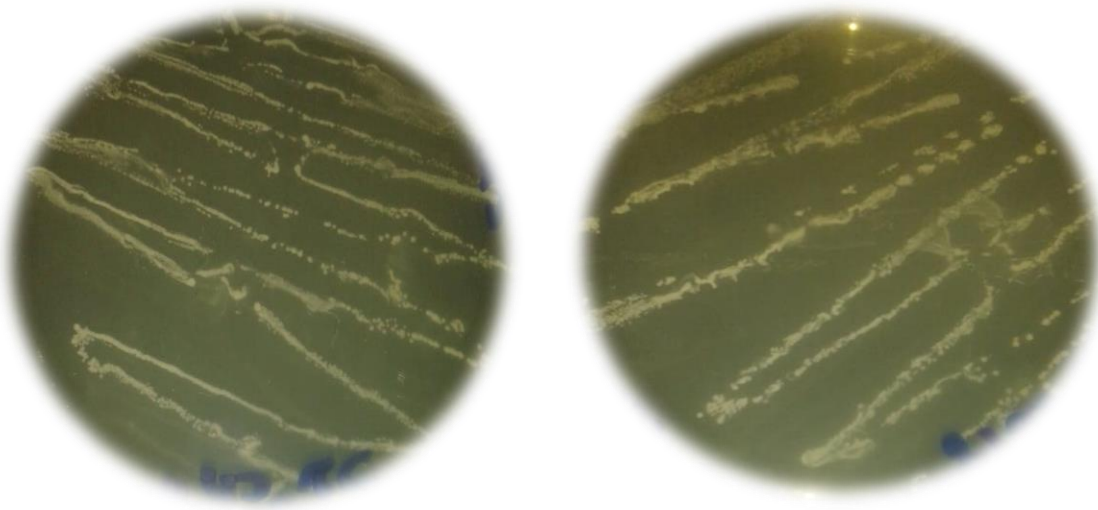
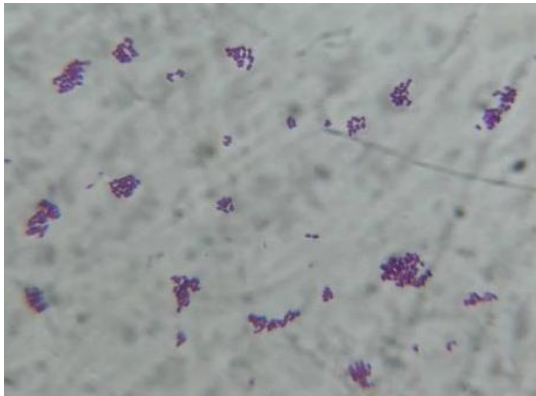


Figure 13: aspect macroscopique sur milieu MRS solide des souches lactiques isolées à partir de *Sardina pilchardus* à 30°C.

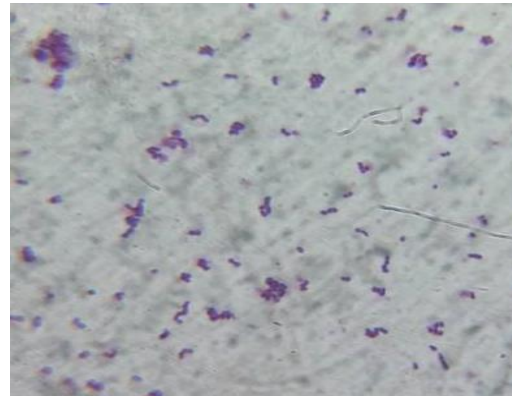
✓ Aspect microscopique des souches

Après coloration de Gram la forme de cellules a été révélée : les bactéries ont la forme de coques et sont disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chaînettes et en amas. Les résultats sont illustrés sur la figure 14 et le tableau 6.

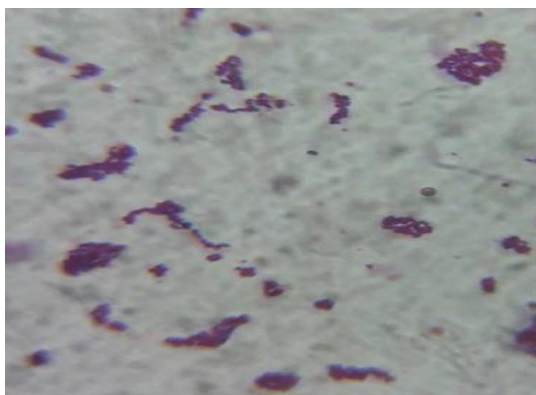
“S1”



“S2”



« S3 »



« S4 »



« S5 »



« S6 »

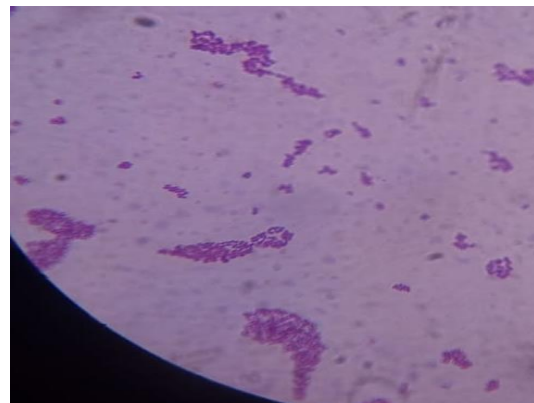


Figure 14 : observation microscopique des souches lactiques après coloration de Gram (Gx100).

Tableau 6: résumé de l'observation microscopique des souches isolées à partir de tractus digestif de *sardina pilchardus*.

Les isolats lactiques	Forme	Arrangement	Gram
S1	Cocci	En amas	Positive
S2	Cocci	Diplocoques et en courte chaîne	Positive
S3	Cocci	Isolées et en Chaîne	Positive
S4	Cocci	Isolées, paires et en chaînettes	Positive
S5	Cocci	Isolées, en tétrades et en courte chaîne	Positive
S6	Cocci	Isolées et en amas	Positive

Le résultat du test de catalase s'est révélé négatif pour toutes les souches (Pas des dégagements gazeux), ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont des souches lactiques (figure 15).



Figure 15 : Catalase négative

IV.2. Identification des isolats

Les tests préliminaires de la pré-identification des isolats étaient basés sur les caractères physiologiques et biochimiques de ces bactéries (voir tableau 7).

IV.2.1. Tests physiologiques

IV.2.1.1. Croissance dans les conditions hostiles

✓ Test de croissance à différentes températures (15 et 37°C)

Cette étude est réalisée à 15 et 37°C pendant 24h et 48h (Badis et al. 2004). Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile.

Tous les isolats poussent bien à 15 °C et 37°C après 24h et 48h d'incubation (figure 16) et (figure 17) Donc toutes les souches sont de type mésophile (Carr et al, 2002).

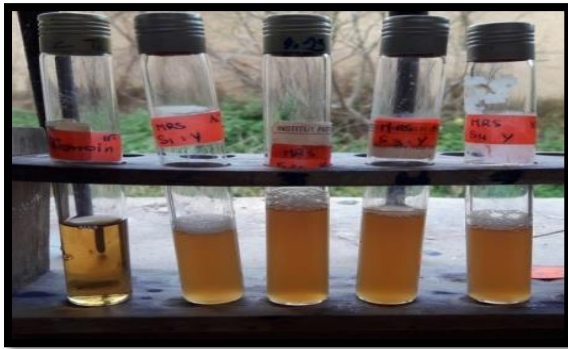


Figure 16 : résultat de croissance à 15°C°.



Figure 17 : résultats de croissance à 37°C°.

✓ **Test de croissance en présence de NaCl**

La mise en culture des souches en présence de 2,5% ; 4% et 6,5% de NaCl, nous a permis d'évaluer leurs aptitudes à croître en présence de ces différentes concentrations.

Les résultats enregistrés ont montré que toute les souches isolées sont capable de croître sur bouillon MRS avec une concentration de NaCl de 2,5% ; 4% et 6,5% (figure 18 et figure 19).



Figure 18 : croissance à 2.5% de NaCl.



Figure 19 : croissance à 4% de NaCl.



Figure 20 : test de croissance à 6.5% de NaCl.

Le résultat obtenu de la croissance des souches à 6,5% a une similarité concernant les *Leuconostocs* avec les quels, la croissance se traduit par un trouble bactérien visible à l'œil nu, Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Zadi et Karam (2006)**, sur la confirmation de l'identification des lactocoques résistants à 6,5% de NaCl qui appartenaient aux espèces *Leuconostoc*.

✓ **Test de croissance à un milieu hyperalcalin**

La croissance sur un milieu MRS à pH = 9,6 se traduit par un trouble bactérien visible à l'œil nu. Toutes les souches poussent sur ce milieu sauf la souche 6. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau numéro 7 et la figure numéro 21.



Figure 21 : croissance en milieu hyperalcalin des isolats lactiques de *Sardina pilchardus*.

IV.2.2. Tests Biochimiques

✓ Test de production de CO₂ à partir du glucose :

Ce test nous a permis de différencier entre les isolats homofermentaires et les isolats hétérofermentaires. Aucune production de gaz (CO₂) n'a été observée chez les souches S1, et S3, ainsi, elles sont considérées comme homofermentaires, cependant les souches S2, S4, S5 et S6 ont manifesté un métabolisme hétérofermentaire (figure 22).

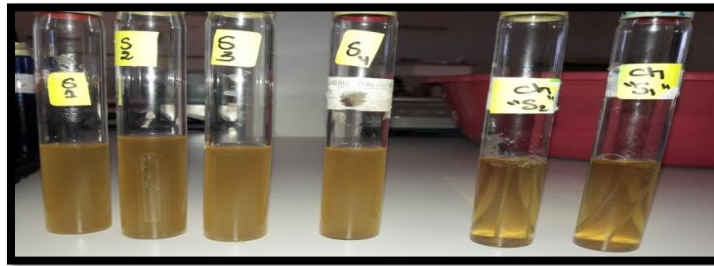


Figure 22 : production du gaz par les isolats lactiques.

✓ Test de production de CO₂ à partir du citrate :

Chez toutes les souches aucune fragmentation de gélose dans les tubes n'a été observée (figure 23)



Figure 23 : production du CO₂ à partir de citrate par les isolats lactiques (résultat négatif).

IV.2.3. Test technologiques

✓ Test de la mise en évidence d'arginine décarboxylase (ADH)

Les souches étudiées (S1, S3, S4 et S6) sont ADH positives et sont capables d'utiliser l'arginine et les deux souches S2 et S5 n'hydrolysent pas l'arginine.

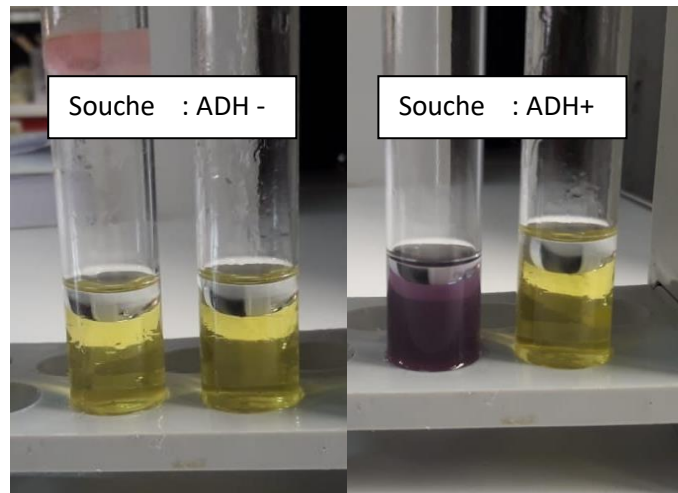


Figure 24: mise en évidence de l'enzyme arginine décarboxylase des isolats lactiques.

✓ Production des Exopolysaccharides

Plusieurs souches de bactéries lactiques produisent des exopolysaccharides qui peuvent être localisées soit dans la capsule, soit étroitement liée à la paroi de la cellule bactérienne, ou excrété au milieu extérieur sous forme de dextrane.

La production des exopolysaccharides à partir de saccharose a été observé chez Les souches (S2 et S5) qui sont capables de dégrader le saccharose et produire le dextrane qui se traduit par l'apparition des colonies larges, visqueuses et gluantes, Comme il est montré dans (la figure 25) alors que les souches (S1, S3, S4 et S6) sont incapables de dégrader le saccharose et produire le dextrane.



Figure 25: observation macroscopique des souches (S2 et S5) sur milieu hypersaccharosé isolées à partir de *sardina pilchardus*

Ce caractère est conforme à celui cité par (Carr et al. 2002 ; Bjorkroth et al. 2006 ; Philippon et al. 2008 ; Ghazi et al. 2009).

Les souches du genre *Leuconostoc* présentent des petites colonies bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose, ce qui a été montré par (carr et al, 2002 ; Badis et al. 2005). Ces observations rejoignent aussi celles de (Du vuyst et al. 2001) qui avaient constaté que les Lactobacilles sont capables de produire des EPS. Selon Walling et al (2001) la production des EPS par les bactéries lactiques est un caractère à intérêt industriel.

✓ Test de la production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs. Tous nos isolats ne produisent pas l'acétoïne. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 26.

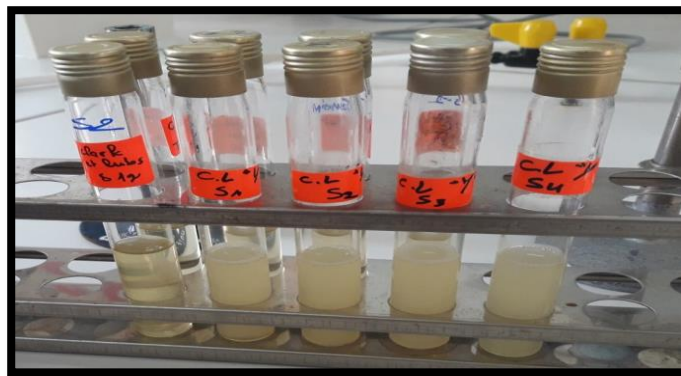


Figure 26 : la production d'acétoïne par les isolats lactiques (résultats négatifs).

✓ Test de la thermorésistance

Cette étude permet de faire la différence entre la flore thermophile et la flore mésophile. Le résultat positif se traduit par un trouble (Rouisset et al, 2006). D'après les résultats obtenus, les souches testées n'ont pas présenté une résistance à 63,5°C.

Le test de la thermorésistance à 63,5°C est représenté dans(la figure numéro 27).



Figure 27 : résultat de la thermoresistance (résultats négatifs) des isolats lactiques de *Sardina pilchardus*.

✓ Test de croissance en présence de bleu de méthylène

Les résultats obtenus par la suite, dans un lait écrémé stérilisé contenant le bleu de méthylène, ont montré que les souches (S1, S2, S3, S4) sont capables de croître en présence du bleu de méthylène 0,1% contrairement aux souches (S5 et S6). Le résultat est illustré sur (la figure numéro 28).

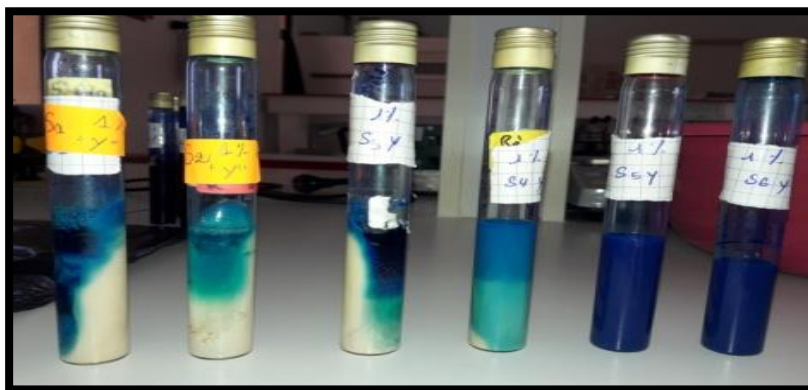


Figure 28 : réduction du bleu de méthylène à concentration 0.1% par les isolats lactiques (S1, S2, S3 et S4)

Le résultat pour le lait de Sherman 0,3% montre que la souche S3 est capable de pousser, alors que les souches (S1, S2, S4, S5 et S6) sont incapables de pousser en présence du bleu de méthylène 0.3% (figure 29).

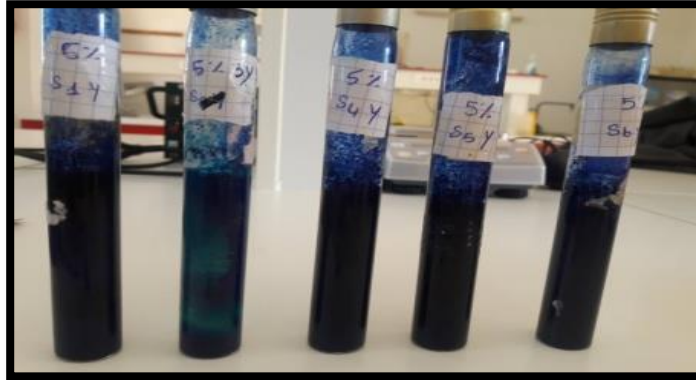


Figure 29 : réduction du bleu de méthylène à concentration 0.3% par l'isolat lactique (S3).

Tableau 7 : Résultats des tests de l'identification physiologique des souches lactiques isolées à partir de *Sardina pilchardus*

Les Isolats lactiques	Croissance à différentes Température		Thermo résistance	Milieu hypercalin	Croissance en présence de NaCl			Production de CO ₂ à partir de :		Croissance en présence de méthylène		ACT	ADH	DEXTRANE
	15 °C	37°C			2.5 %	4 %	6.5 %	Glu	citrate	0.1 %	0.3 %			
S1	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+/-	-	-	+	-
S2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-	+
S3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+/-	+	-	+	-
S4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+	-
S5	+	+	-	+	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	+
S6	+	+	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	+	-

+ : réactions positives, - réactions négatives, +/- réponse variable selon les espèces.

ACT : production d'acétoïne, DXT : production de dextrane, ADH : production de l'arginine dihydrolase, Glu : glucose.

IV.3. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien

Après la confirmation de l'appartenance de 06 souches isolées, au groupe des bactéries lactiques, la méthode par diffusion sur milieu solide utilisée pour la détection des inhibitions. Elle se traduit par la formation d'un halo autour de la souche ensemencée par disque. La lecture de résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition de la souche indicatrice. L'inhibition est considérée comme positive si le diamètre de la zone est supérieur à 6mm.

Les souches pathogènes utilisées dans cette étude sont : *Candida albicans*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus sont présentés en partie dans (les figures numéro 30, 31, 32 et 33) et regroupées dans (le tableau numéro 8).

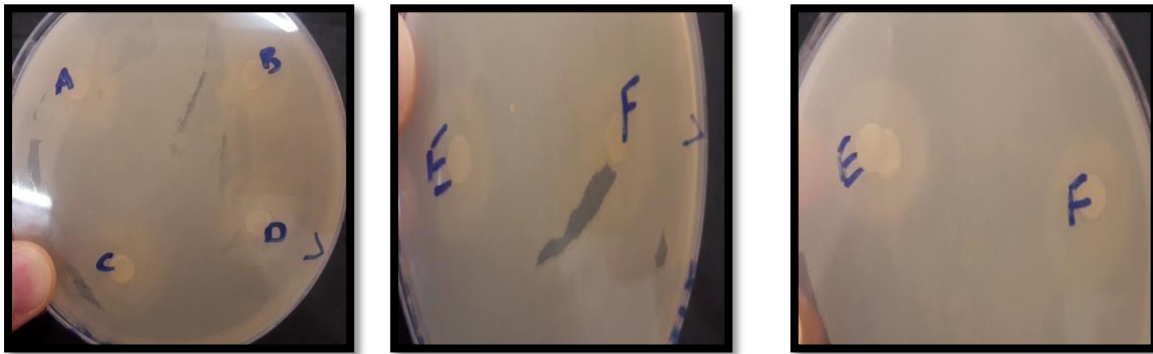


Figure 30 : inhibition de la souche indicatrice *Bacillus cereus* par les souches lactiques.

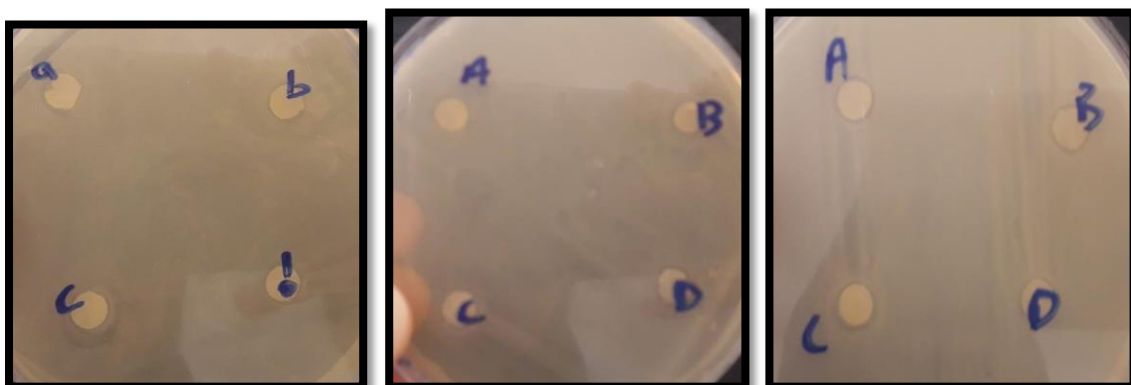




Figure 31 : inhibition de la souche indicatrice *pseudomonas aeruginosa* par les souches lactiques.

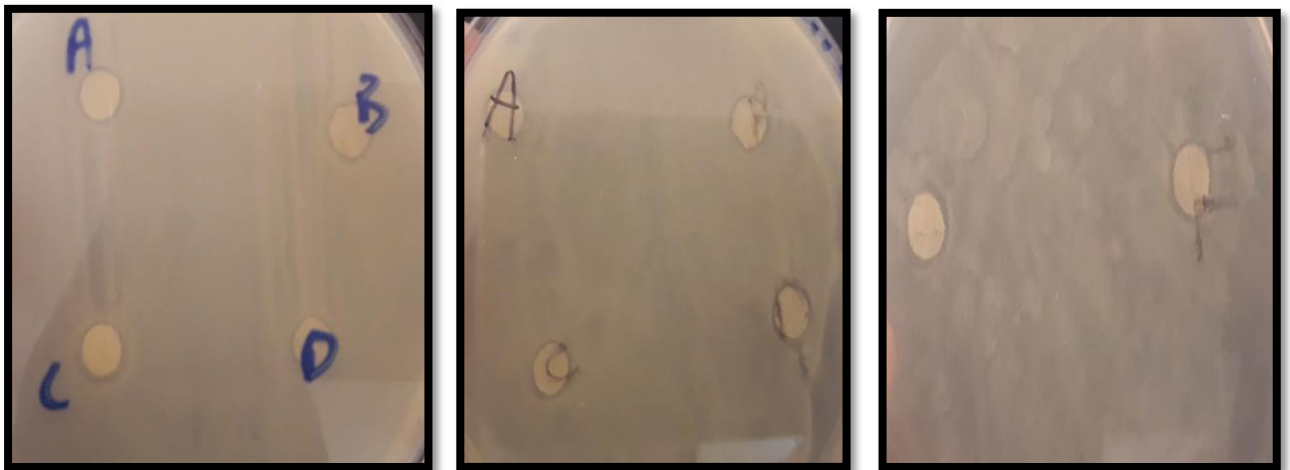


Figure 32 : inhibition de la souche indicatrice *E.coli* par les souches lactiques.

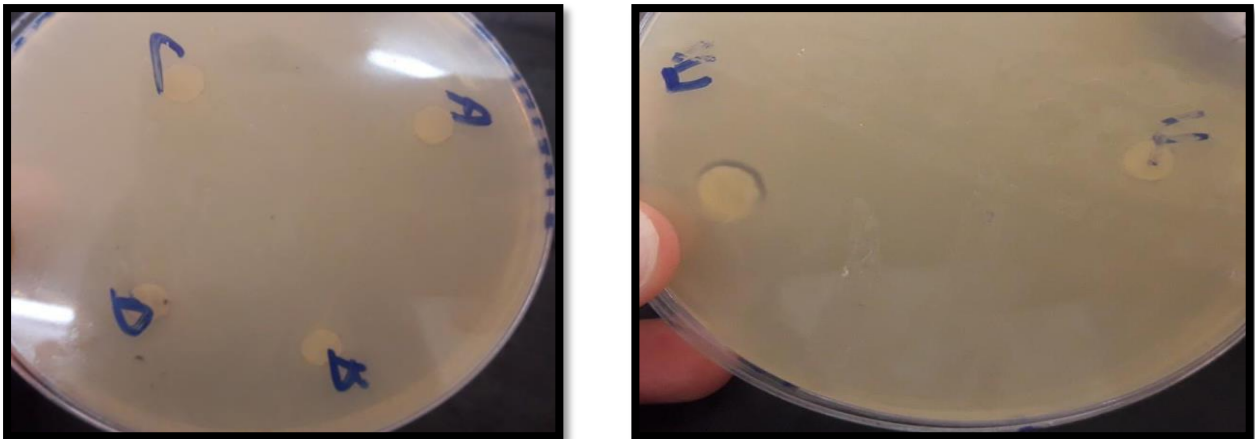


Figure 33 : inhibition de la souche indicatrice *S.aureus* par les souches lactiques.

Tableau 8 : activité inhibitrice de 06 isolats lactiques.

Souches Indicatrices	Méthode direct						Méthode indirect											
	Culture bactérienne						Surnagent de culture						Surnagent neutralisé					
	YZ1	YZ2	YZ3	YZ4	YZ5	YZ6	YZ1	YZ2	YZ3	YZ4	YZ5	YZ6	YZ1	YZ2	YZ3	YZ4	YZ5	YZ6
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>B.cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

○ + inhibition, - absence d'inhibition.

○ dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre 02 et 23 mm

D'après les résultats regroupés dans le tableau 8, les pouvoirs inhibiteurs de nos isolats sont très variables. On note que les 06 isolats ont inhibé 04 sur 05 bactéries indicatrices testées.

Parmi les souches de bactéries lactiques, la plupart des isolats ont inhibé la croissance des souches indicatrices (*P.aeruginosa*, *E.coli*, *B.cereus*). Les zones d'inhibitions étaient toujours très prononcées indiquant la possibilité d'inhibition de ces souches de bactéries par les 06 isolats lactiques.

Mais, l'effet inhibiteur de ces isolats était moins importants contre *S.aureus* et absent contre *Candida albicans*.

L'étude de l'inhibition de *B.cereus* et *E.coli* et *P. aeruginosa* par les 06 souches de bactéries lactiques à montré des zones d'inhibition supérieur à 6mm de diamètre. En revanche, la moitié ne présente pas d'activité antibactérienne contre *S.aureus*.

D'après ces résultats on constate que la souche indicatrice la plus sensible à nos isolats est *B.cereus*, elle est inhibée par les 06 isolats. Les souches indicatrices *P. aeruginosa* et *E.coli* sont inhibées par 3 et 4 isolats respectivement, alors que *S.aureus* à été inhibée par 2 isolats

lactiques et dans le cas de souche indicatrice *Candida* il y' a une absence d'inhibition.

Lors des résultats rapportés dans cette étude, on constate que beaucoup des souches de bactéries lactiques isolées de *Sardina pilchardus* avait un effet inhibiteur sur telles bactéries pathogènes à Gram + et à Gram – avec différents diamètres d'inhibitions.

La méthode par diffusion sur milieu solide est utilisée pour la détection des inhibitions. Ce test dont le principe est de mettre en culture et en contacte des souches bactériennes, permet non seulement de mettre en évidence les interactions négatives due au métabolisme des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes mais aussi d'apprécier relativement l'importance des inhibitions observées et ceci par mesure de la dimension des halos clairs.

(Benreguieg, 2015)

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **(Chemlal, 2013)** qui ont montré que le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques est très souvent lié à leurs propriétés acidifiantes, phénomène impliqué plus particulièrement dans l'inhibition des flores pathogènes et des germes d'altération. Ces propriétés inhibitrices sont attribuées à la production d'acides organiques, notamment lactique et acétique. L'effet inhibiteur de ces acides est étroitement lié à la diminution du pH du milieu qui atteint en fin d'incubation des valeurs inférieures à pH 5. Les propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens. En effet, les bactéries lactiques ont la propriété de produire de nombreuses substances antimicrobiennes telles que les acides organiques (acide lactique), du peroxyde d'hydrogène, du CO₂, du diacétyl, de l'acétaldéhyde et des bactériocines. Plusieurs revues et travaux de recherche rapportent le potentiel des bactéries lactiques utilisées comme cultures ajoutées pour inhiber des microorganismes pathogènes présents dans les aliments, notamment l'inhibition de *L. monocytogenes* en présence de bactéries lactiques dans le saumon fumé. **(Tahiri, 2007)**

CONCLUSION

Conclusion

Les bactéries lactiques ont un intérêt primordial en alimentation il y a au moins quatre mille ans que l'homme se sert de ces bactéries pour la fermentation des aliments, et sont connues pour leur aptitude à produire des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes mais aussi d'être utilisées en tant que bio-conservateurs.

L'objectif capital de cette présente étude est de définir, les principaux composants de la flore lactique du poisson marin (*Sardina pilchardus*) pêché de la côte occidentale algérienne.

A cet égard, cette étude représente une contribution à l'étude d'une flore lactique qui reste jusqu'à ce jour frappé d'un perpétuel anonymat. A cet effet, les objectifs de cette recherche ont été essentiellement d'isoler et de caractériser sur le plan biochimique et technologique des bactéries lactiques isolées de poissons précité et de sélectionner celles dotées d'une activité antimicrobienne vis-à-vis d'un certain nombre de germes pathogènes généralement impliqués dans l'altération des produits carnés et/ou de pêche ou impliqués dans les intoxications alimentaires.

La première partie de cette étude nous a permis d'isoler, caractériser et identifier 6 souches de bactéries lactiques essentiellement entre : *Streptococcus spp* et *Enterococcus spp*.

Il ressort de ces résultats que le tube digestif de *Sardina pilchardus* est une véritable niche écologique pour les bactéries lactiques qui méritent plus d'attention et d'études approfondies.

La détermination de leur capacité à produire des substances inhibitrices contre leurs souches cibles (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Candida albicans* ATCC 10231) a été démontrée par contact direct cellule-cellule et indirect entre la souche productrice et la souche indicatrice.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que parmi les souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6) isolées et purifiées à partir du tube digestif du (*Sardina pilchardus*) 04 sur 05 de bactéries indicatrices testées ont été inhibées.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Achemchem F, 2014.** Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre. Presses académiques Francophones.24-25p
- **Alice A.F and Sanchez-Rivas C, 1997.** DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Curr. Microbiol.* 35:309–315
- **Allouche F.N, Hellal A, Laraba A, 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie.*, 3: 13-20
- **Axelsson L, 2004.** Classification and physiology. *In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. ET Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York.1-66.

B

- **Badis et al.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia Et Kabyle". *Sciences & Technologie C – N°23, juin (2005), pp. 30-37.*
- **Bekhouche F, 2006.** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie. Université de Constantine. 21p
- **Belarbi F, 2011.** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Thèse de magister. Université d'Oran ES-Senia. 39p.
- **Belkheir k, 2017.** caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelles d'Algérie. Relation de ferments lactiques. Thèse doctorat en science. Université d'Oran. 10p
- **Benasla A, 2012.** Production d'exopolysaccharides par des souches de lactobacilles. Thèse de Magister en Biotechnologie. Université d'ORANES-Senia.
- **Benguendouz A, 2018.** Caractérisation nutritionnelle, toxicologique et aptitudes technologiques de « *Sardine pilchardus* » pêchée dans la côte Algérienne. Thèse de doctorat en sciences. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. 5-7p

- **Benreguieg M, 2015.** Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de Brebis dans la région de l'Ouest Algérien. Thèse de doctorat en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
- **Bjorkroth J, Holzapfel WH. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* In: The Prokaryotes. Springer .vol 4: 273-286.
- **Boudjema K, 2008.** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Université M'Hamed Bougara Boumerdès.
- **Bourel G, Henni S, Krantar K, Oraby M, Divies Cet Garrmyn D, 2001.** Métabolisme sucre-citrate chez *Lenconostoc mesenteroides*. Le lait 81 : 75-82.
- **Bultel A, 2017.** Les probiotiques aujourd'hui : Où en est-on ?. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Lille 2. 55 – 56p

C

- **Calvez S, Belguesmia Y, Prévost H, Drider D et Kergourley G, 2009.** Les bactériocines : de la synthèse aux applications. Bacteries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .Paris.
- **CARR, F. J, CHILL, D. ET MAIDA, N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey Critical Rev. Microbiol. 28: 281-370
- **Chemlal-Kherraz D, 2013.** Isolement et identification des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique. Thèse de doctorat en biologie. Université d'oran.
- **Chlaida M, 2009.** Variabilité allozymique associée au flux migratoire des populations des sardines, sardina pilchardus, le long de la cote nord ouest africaine. Thèse de doctorat en biologie. Université Mohammed V- AGDAL Faculté des sciences Rebat. 28p
- **Codex alimentarius.2003.** Codex standard for fermented milk.CODEX STAN.243:1-5.

D

- **Daly C., Fitzgerald G. F., O'connor L. and Davis R.. 1998.** Technological and health benefits of dairy starter cultures. *International Dairy Journal* 8,195-205.
- **De Vuyst LF, De Vin F, Vaningelgem et B.Degeest. (2001).** Recent development in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* 11, 687-707.

- **Diop Bakar M., Dubois-Dauphin R., Tine E., Ngom A., Destain J., Thonart P.,** 2007. Bacteriocin producers from traditional food products., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 11(4): 275-281

F

- **F.O. Ekundayo, 2014.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soils of three fruit trees, fish and ogi. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* ISSN: 2319-7706 Volume 3 Number 3 (2014) pp. 991-998.

G

- **Ghazi F, Hienni DE, Benmchernene Z, Kihal M. (2009).** Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for identification of Dominants Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 4 (1): 78-87.
- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition: Dunod. Paris : 615p

H

- **Hassaine O, 2013.**Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien .**Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'oran**
- **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Boihadid D., 2009.** Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieu a base des extraits de caroube. *Rev.Microbiol. Ind. San et Environn.* P: 37-55
- **Hugenholtz J., Sybesma W., Groot M. N., Wisselink W., Ladero V., Burgess K., Van Sinderen D., Piard J.C., Eggink G., Smid E. J., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P. and KleerebezemL M.. 2002.** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of neutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82. P217-235.
- **Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011.**Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407

I

- **Izquierdo A, 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. 17-18p
- **Izquierdo E., Wagner C., Marchioni E., Aoude-Werner D., Ennahar S., 2009.** Enterocin 96, a novel Class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. *Appl. Env. Microbiol.*, 75(13): 4273-4276

J

- **Joubert D, 2016.** Les ferments lactiques. Revue des ENIL N° 345-12-2016. 23p

K

- **Kihal M.. 1996.** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat. Université d'Oran.
- **Karam N-E., Zadi-Karam H., Lazreg L., Dalache F., 2008.** Bactériocines de bactéries lactiques: caractérisation d'une bactériocine d'*Enterococcus* BO2. *Renc. Rech. Ruminants.*, 15: 72

L

- **Lane C. N. and Fox P. F.. 1996.** Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **6** :715-728.
- **Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A.,Gruss A. et Le Loir Y.. 2001.** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81,19-28.
- **Lima E.T., Andreatti Filho R.L., Okamoto A.S., Noujaim J.C., Barros M.R., Crocci A.J., 2007.** Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research.*, 71: 103-107
- **Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D. 1996.** Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* **6** :851-867.

M

- **Mahi M, 2010.** Etude technologique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis. Thèse de magister. Université d'Oran.
- **Makhloufi K M, 2011.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. 6p
- **Mami A, 2012.** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran
- **Menad N, 2017.** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse de doctorat en sciences. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. 4p

- **Metlef S., Dilmi-Bouras A., 2009.** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Revue Nature et Technologie.*, 1: 33-44
- **Molinos A. C., López R. L., Abriouel H., Omar N. B., Valdivia E., Gálvez, A., 2009.**Inhibition of *Salmonella enterica* cells in Deli-Type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.*,1(1): 85-90
- **Moumene M, 2015.** Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université 8 mai 1945-Guelma

N

- **Najjari A et al; 2007.** Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International Journal of Food Microbiology* 121 (2008) 342–351

P

- **Penaud S, 2006.** Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lb.delbrueckii*sp. *Bulgaricus* ATCC 11842. Thèse de Doctorat. Istitut National Agronomique deParis-Grignon.
- **Philippon A et Poyart C. (2008).** Autres coques à Gram positif catalase negative d'intérêt medical: *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. EMC Elsevier Masson SAS. Biologie clinique. 90-05-0120. 1-11.
- **Piquepaille C, 2013.** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de limoges.

R

- **Rouissat, L. and Bensoltane, A. (2006).** Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 567-582.

S

- **Sahnouni et al.** Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast. African Journal Of Microbiology Research vol.6(13), pp. 3125-3133, 9 april 2012
- **Sahnouni F, 2013.** Isolement, identification biochimique et technologique des bactéries lactique isolées de poissons marins (*sardina pilchardus et Boops boops*) pêchés dans la cote occidentale algérienne et mise en évidence de leur pouvoir bioconservateur cas de la crevette rose (*Aristeus antennatus*). Thèse de doctorat en biologie. Université d'oran.
- **Streit F et al, 2007.** Acidificationimprovescryotoleranceof *Lactobacillus delbrueckii*subsp. *Bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* Feb 20; 128(3):659-67. Epub 2006 Nov 25.
- **Sutra L., Federighi M. et Jouve J. L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : POLYTECHNICA, Paris, 308(6) : 31-249.

T

- **Tahiri I, 2007.** Isolement, caractérisation et étude du potentiel de la divergicine M35, pour la bio-conservation des produit marins prêts à consommer. Thèse de doctorat. Université Laval Québec.

V

- **Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 82, 187–216.
- **Vizoso Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U. et Holzapfel W.H.. 2006.** *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J.Food Microbiol* **109** :205-214.

W

- **Walling EG, Indreau E et Lonvaud-Funel A. (2001).** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. INRA. 289-300.

Y

- **Yang et al.** Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. . *AMB Express* 2012, 2:48

Z

- Zadi-Karam H. et Karam N-E. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de Lactococcus résistantes au sel Tropiculture. pp 153-156.
- **Zergoug A, 2017.** Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem. 41p

ANNEXE

Milieux d'isolement

☞ **Milieu MRS** (De Man Rogosa et Sharp, 1960)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone.....10,00g
- Extrait de viande..... 10,00 g
- Extrait de levure.....5,00g
- Glucose 20,00g
- Phosphatdipotassique.....2,00g
- Acétate de sodium5,00g
- Citrate d'ammonium.....2,00g
- Sulfate de magnésium.....0,20g
- Sulfate de manganèse.....0,05g
- Agar bacteriologique15,00g
- Eau distillée1000 ml

pH =6 ,8 ±0,1 Autoclaver à 120° pendant 20min

☞ **MRS liquide** tout les ingrédients du **MRS solide** mais sans Agar

Milieux d'identification

☞ **Milieu Moller :**

- Peptone pepsique.....5g
- BCP(pourpredeBromocrésol).....0,01g
- Extrait de viande5g
- Rouge de crésol0,005g
- Glucose.....0,5g
- Pyridoxal.....0,005g
- Arginine.....10g
- Eau distillée..... 1l

☞ **Clark et Lubs :**

- Peptone.....5g

- Phosphate dipotassique.....5g
- Glucose.....5g
- Eau distillée..... 950ml

Ph=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **laitécrémé :**

- laitécrémépoudre10g
- Extrait de levure 0,5g
- Eau distillée1l

Autoclavage 110°C pendant 10min

☞ **Bouillon hypersalé :**

- Extrait de viande 5g
- Glucose 5g
- Peptone 15g
- NaCl25/40/65g
- Eau distillée1l

Ph=7,2. Autoclavage 120°C pendant 20 min

☞ **Milieu Muller –Hinton (Muller et Hinton, 1941):**

- Infusion de viande de boeuf.....3000ml
- Peptone de caséine.....17,5g
- Amidon de maïs.....1,5g
- Agar-agar.....17g
- Eau distillée 1l

pH=7,4. Autoclavage: 120°C pendant 20minutes.

☞ **Eau physiologiquepeptonée :**

- Chlorure de sodium8,5g
- Peptone.....0,5g
- Eau distillée950ml

pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **Gélose blanche:**

- Agar_agar..... 16g
- Eau_distillée.....1l

Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **bouillon nutritif:**

- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- Peptone.....5g
- Chlorure de sodum.....5g
- Eau distillée1000ml

pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **Le lait de Sherman (Bourgeois et Leveau, 1991):**

- laitécraméépoudre10g
- Extrait de levure.....0,5 g
- Eau distillée 1000 ml

pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0,1% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1% déjà stérilisé à 120°C pendant 20min. Et pour avoir un lait à 0,3% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 3%.

☞ **Milieu hypersaccharosé :**

- Extrait de viande.....10g
- Extrait de levure..... 3g
- Peptone..... 2.5g
- Saccharose150g
- K₂HPO₄..... 2g
- Nacl..... 1g
- MgSO₄ 7H₂O0.2g
- Agar..... 15g

- Eau distillée..... 1000 ml

Autoclavage 120°C/ 20 minutes